Методы генетической инженерии

Р. Девис
Д. Ботстайн
Дж. Рот

Генетика бактерий

Москва ·Мир·


ИЗДАТЕЛЬСТВО
МИР

A Manual for genetic engineering
Advanced Bacterial Genetics

Ronald W. Davis
Stanford University
David Botstein
Massachusetts Institute of Technology
John R. Roth
University of Utah

Cold Spring Harbor Laboratory
Cold Spring Harbor, New York 11724
1980

Методы генетической инженерии

Р. Девис
Д. Ботстайн
Дж. Рот

Генетика бактерий

Перевод с английского
канд. биол. наук Ю. Н. Зографа
под редакцией
чл.-корр. АН СССР Р. Б. Хесина

Москва «Мир» 1984

ББК 28.04
Д 25
УДК 575+57.08

Девис Р., Бодстайн Д., Рот Дж.

Д 25 Методы генетической инженерии. Генетика бактерий: Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. — 176 с., ил.

Книга представляет собой практическое руководство по генетической инженерии бактерий, написанное американскими авторами. Подробно изложены методы экспериментов с мигрирующими генетическими элементами, методы конструирования гибридных молекул ДНК, техника работы с фаговыми, плазмидными и бактериальными ДНК. Справочный раздел содержит сведения о наиболее употребляемых средах для культивирования бактерий, условиях хранения штаммов бактерий и препаратов ДНК, ферментах рестрикции, физических картах плазмидных и фаговых векторов и т. д.

Предназначена для молекулярных биологов, биохимиков, генетиков, микробиологов, вирусологов.

Д $\frac{2001040000-467}{041(01)-84}$ 128—84, ч. 1

ББК 28.04
57.023

Редакция литературы по биологии

От редакции

Предлагаемая вниманию читателей книга — прекрасное руководство по новейшим методам работы с генетическим материалом (бактерий, фагов, плазмид) применительно к задачам генетической инженерии. Авторы книги известные специалисты в области молекулярной генетики микроорганизмов, сотрудники такой авторитетной для биологов лаборатории, как Коулд-Спринг-Харбор, руководимой лауреатом Нобелевской премии Дж. Уотсоном.

Книгу отличает четкость и ясность изложения, высокий научный уровень и актуальность представленных материалов. По сравнению с изданными ранее в СССР руководствами — Клаус Р. и Хейс У. Сборник методик по генетике микроорганизмов. — М.: Медицина, 1970 и Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976 — данное руководство отличается тем, что в нем изложены новейшие методы, используемые в опытах по генетической инженерии. Их освоение необходимо для успешного развития биотехнологии и создания микроорганизмов, имеющих важное промышленное значение, а также для проведения исследований в области молекулярной генетики.

Сокращения, принятые в книге

БОЕ — бляшкообразующие единицы
БСА — бычий сывороточный альбумин
ДМСО — диметилсульфоксид
ДСН — додецилсульфат натрия
ДТТ — дитиотреитол
ЭГТА — этиленгликоль (2-аминоэтиловый эфир NN′-тетраацетата)
ЭДТА — этилендиаминотетрауксусная кислота

Предисловие

За последние пять лет произошел переворот в методах, применяемых в молекулярной генетике. Переворот этот включает два основных момента — во-первых, развитие методов рекомбинантных ДНК, т. е. методов выделения генов и различных манипуляций с выделенными генами, а во-вторых, открытие и использование способных к перемещениям элементов устойчивости к лекарственным препаратам (транспозонов). Предлагаемое руководство содержит описание экспериментов, которые должны продемонстрировать обе эти новые технологии, причем сделать это таким образом, чтобы знакомые с основами генетики бактерий молекулярные биологи легко могли их освоить. В известном смысле предлагаемая книга служит продолжением (но не заменяет) изданного восемь лет назад руководства J. H. Miller, «Experiments in Molecular Genetics» (Дж. Миллер, «Эксперименты в молекулярной генетике», М.: «Мир», 1976). Предполагается, что изложенные там основные приемы работы читателю уже известны; здесь мы не повторяем ни одного эксперимента, описанного в том руководстве.

Одна из основных сложностей, с которыми сталкиваются ученые, желающие использовать в своих исследованиях современные генетические методы (особенно методы молекулярного клонирования), состоит в огромном количестве основной информации и методов, необходимых для работы в области генетики бактерий и фагов. Мы надеемся, что данное руководство (и университетские курсы, использующие его) сделает эту технологию более доступной.

В основе своей предлагаемое руководство было разработано для трехнедельного курса современной генетики бактерий, который мы преподавали в течение последних четырех лет в лаборатории в Коулд-Спринг-Харборе. Очевидно, что данное пособие может быть использовано и несколько иначе. Во-первых, еще до того как эта книга была опубликована, мы получили на нее множество запросов, из чего следует, что этим пособием будут пользоваться в исследовательских лабораториях просто как сборником методик. Во-вторых, мы надеемся, что оно окажется полезным при проведении практикумов повышенного типа (на уровне аспирантуры). По нашему мнению, такие практикумы для окончивших институт можно составить, взяв некоторые эксперименты из упоминавшегося выше руководства

«Эксперименты в молекулярной генетике», а некоторые — из данного руководства. Мы рекомендуем сделать именно так.

Одна из необычных особенностей предлагаемого руководства состоит в том, что в приводимых методиках используется *Salmonella typhimurium*. Частично это отражает интересы авторов и их квалификацию. Однако оказалось, что использование этой бактерии имеет большие преимущества. Особенности генетики *Salmonella* и *Escherichia coli* одинаковы, но работать с транспозонами с *Salmonella* легче и быстрее (особенно в случае экспериментов с использованием трансдукции). Но, что более существенно, клонирование генов *Salmonella* в клетках *E. coli* служит надежной моделью для всех видов молекулярного клонирования. Вполне возможно, что клонированные гены будут фукционировать (подобно некоторым генам дрожжей), однако гомология настолько ограничена, что рекомбинация между клонированными генами и генами клетки-хозяина не осложняет работы. Кроме того, эти эксперименты наглядно иллюстрируют связь между генетическими манипуляциями in vitro с геном, клонированным в клетках *E. coli*, и генетическим анализом структуры и функции того же самого гена in vivo в том организме, из которого он происходит. Как нам кажется, преимущества изучения тех организмов, с которыми возможны генетические манипуляции, могут стать еще большими с развитием методов рекомбинантных ДНК.

Мы признательны Питеру Уенсенку и Джеффри Миллеру, которые вместе с нами вели первые варианты этого курса в лаборатории в Коулд-Спринг-Харборе. Курс этот (как и его содержание) никогда бы не увидел свет, не будь поддержки многочисленных наших помощников, каждое лето трудившихся над курсом и его переработкой. Это Джон Карлсон, Форрест Чамли, Питер Джерген, Марк Джонстон, Дуглас Кошланд, Стивен Лэм, Барбара Мейер, Пол Риггс, Марк Роуз, Том Сент-Джон, Стюарт Шерер, Молли Шмидт, Дэн Стинчкомб и Фред Уинстон.

Сотрудники лаборатории в Коулд-Спринг-Харборе были полны энтузиазма и оптимизма, особенно во многих кризисных ситуациях. Рей Джестеланд, а затем и Джик Хикс заслуживают наибольшей благодарности. Энн Бушнелл оказала бесценную помощь при нашем обучении электронной микроскопии. Энн Стреферн мы приносим особую благодарность за подбор штаммов. Ненси Форд и ее сотрудники были замечательно терпимы и внимательны при подготовке рукописи. Надин Дамсер и Мэри Мосчитта заслуживают быть отмеченными особо в связи с их усилиями при издании и подготовке окончательного варианта рукописи, который здесь и воспроизведен.

Мы признательны Александру Кону за разрешение воспроизвести некоторые его карикатуры, которые мы разбросали по

всей книге. Эти изобретательные эскизы, украшающие стены Давенпортовской лаборатории, уже ряд лет забавляют как студентов, так и преподавателей. Вацлав Шибальский любезно снабдил их подписями.

Нам приятно также выразить признательность компаниям, предоставляющим бесплатно материалы для использования при обучении на этих курсах: Bethesda Research Laboratories, Inc., Rockville; Maryland; Boehringer-Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana; New England Biolabs, Beverly, Massachusetts; New England Nuclear, Boston, Massachusetts и Schleicher and Schuell, Keene New Hampshire.

Наконец, мы признательны Джиму Уотсону за его поддержку генетики бактерий как науки, значение которой в современной молекулярной биологии не теряет своей силы.

Р. Девис, Д. Ботстайн, Дж. Рот

Введение

Структура книги и содержание

Данное руководство состоит из трех разделов: «эксперименты», «методики» и «приложения». В тринадцати взаимосвязанных экспериментах описаны в общих чертах их назначение, основной подход и методики, использованные для решения конкретных задач. Методики подробно расписаны по этапам, причем в одном эксперименте может быть использовано несколько методик. В приложения вынесена общая информация, извлеченная из двух первых разделов книги. Разделы, в которых описываются эксперименты и методики, включают также специально выделенные обсуждения, в которых объясняются отдельные стадии, а также содержатся предложения по поводу дальнейших экспериментов и контролей.



Курсы по генетике в лаборатории Коулд-Спринг-Харбор на протяжении более 35 лет проводились в здании Давенпортовской лаборатории, построенном в 1927 г. Первые такие курсы, посвященные вирусам бактерий, вел в этом здании в 1945 г. Макс Дельбрюк. Эти курсы проводили такие замечательные ученые, как Сеймур Бензер, Герман Калькар, Аарон Новик, Лео Сцилард и Гюнтер Стент. На фотографии (начала 50-х годов) показано старое здание, возведенное по проекту Генри Сейлора, архитектора из Хантингтона, Лонг-Айленд.

Раздел «Эксперименты» составлен таким образом, чтобы разные эксперименты дополняли друг друга и оказались взаимозависимыми. Например, в эксперименте 7 строится генетическая карта делеций. В эксперименте 10 эта карта сопоставляется с физической картой; при этом используются материалы экспериментов 8, 9 и 12. Эти эксперименты не обязательно проводить последовательно. В трехнедельном курсе, преподаваемом в Коулд-Спринг-Харборе, они выполнялись в значительной мере одновременно.

Подразумевается, что методики служат для выполнения этих экспериментов, но они представляют определенную ценность и сами по себе. Отдельные методики можно использовать при решении разнообразных задач, при этом они описаны таким образом, чтобы быть по возможности независимыми друг от друга. Книга построена так, чтобы легче было пользоваться ею в лаборатории: поэтапное описание операций приводится отдельно от обсуждения таких вопросов, как обоснование и план эксперимента. Мы надеемся, что методики окажутся полезными в исследовательских лабораториях и сами по себе.

В руководстве приведен также список штаммов, необходимых для предлагаемых экспериментов и методик. В некоторых случаях (например, при клонировании в векторах λ) указано несколько приемлемых штаммов, из которых нужно использовать, естественно, лишь один. Полный набор штаммов фагов и бактерий можно приобрести в лаборатории Коулд-Спринг-Харбор.

Правила работы и безопасность

В большинстве экспериментов, излагаемых в этом руководстве, используется *Salmonella typhimurium*. После многих лет культивирования в лабораторных условиях штамм LT2 *S. typhimurium* (из которого получены все используемые здесь штаммы), по-видимому, уже более не патогенен для человека, хотя и происходит от штаммов, которые несомненно были способны вызывать диарею. За много лет использования в лабораториях *S. typhimurium* LT2 ни разу не сообщалось о случаях инфекции, хотя известно о нескольких случаях заражения людей сходными штаммами (например, LT7 или 1559). Штамм LT2 оказывается ослабленным также и для мышей, хотя в высоких дозах может еще их убивать.

Поэтому все эксперименты следует проводить, пользуясь обычными благоразумными приемами работы с бактериями. Стеклянную посуду, находящуюся в контакте с культурами, прежде чем мыть, необходимо стерилизовать. Стерилизовать нужно и сами культуры. Отходы (чашки Петри) нужно перед их удалением стерилизовать или сжигать дотла. Следует запре-

тить засасывать материал в пипетки ртом, хотя мы спокойно относимся к пипетированию *разведенных* суспензий бактерий (и фагов) ртом.

Некоторые эксперименты, приведенные в данном руководстве, включают опыты с рекомбинантными ДНК. Такие опыты, однако, не подпадают под действие Правил по работе с рекомбинантными ДНК Национальных институтов здравоохранения (НИЗ), так как известно, что и в обычных условиях могут образоваться рекомбинанты между *S. typhimurium* и *E. coli* за счет рекомбинации между их хромосомами. Тем не менее при работе с рекомбинантами мы принимаем те же меры предосторожности, что и при работе с самой *Salmonella*.

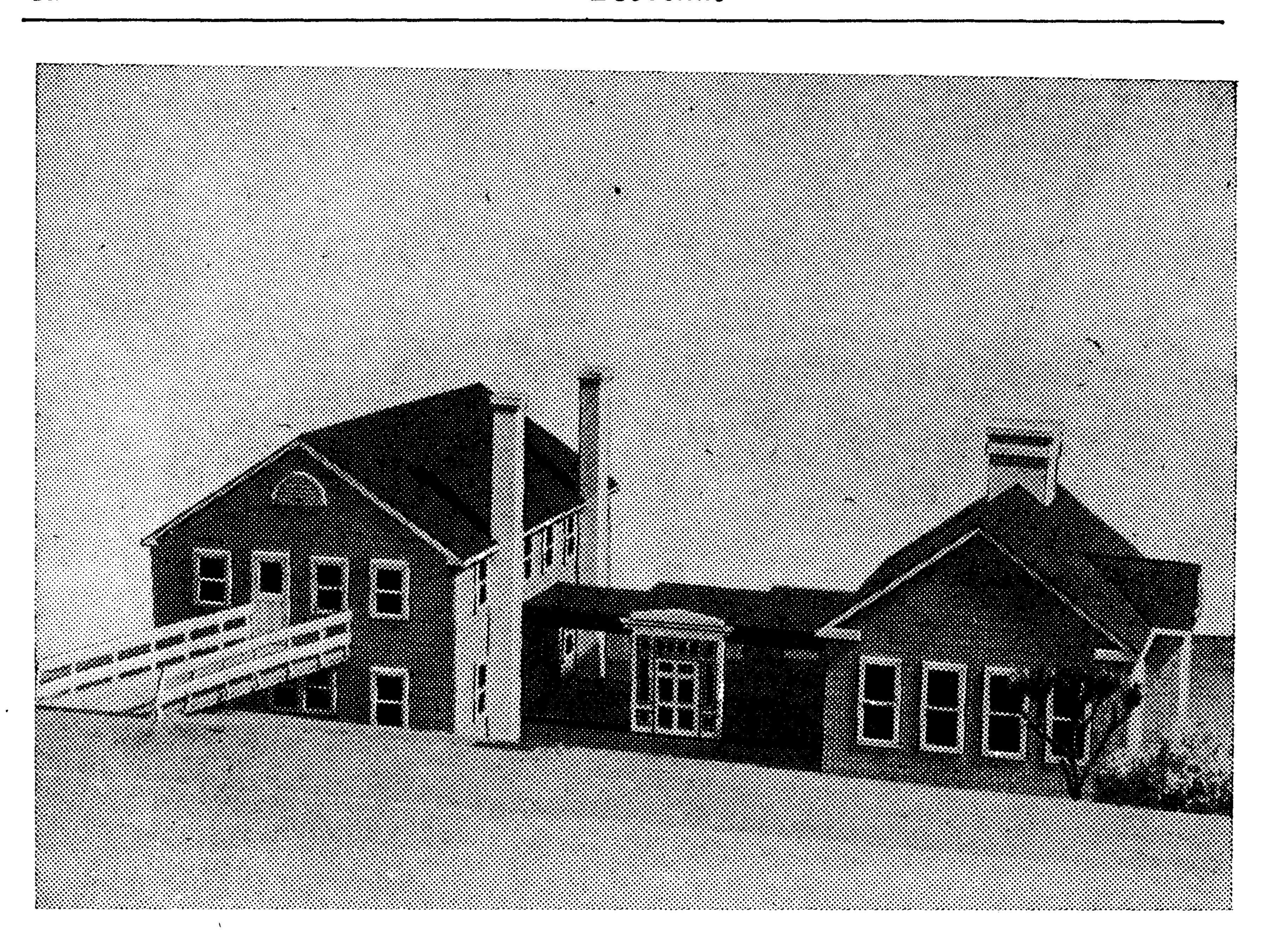
При использовании ДНК, выделенной из организмов, отличных от *Salmonella*, описанные здесь эксперименты могут подпадать под правила НИЗ, и перед тем, как их проводить, нужно познакомиться с этими правилами. Все штаммы, используемые нами в качестве клеток-хозяев для рекомбинантных ДНК, являются производными *E. coli* K12. Поэтому фактически все незапрещенные эксперименты требуют самое большее P1-уровня физической защиты.

Номенклатура штаммов и мутаций

Как для *E. coli*, так и для *Salmonella* используется одна и та же унифицированная система обозначений. Система эта была впервые предложена Демерецем и др. (Demerec et al., 1966). Чтобы приспособить ее и к IS-элементам (инсерционным элементам), были добавлены новые правила. Эти изменения описали Кэмпбелл и др. (Campbell et al., 1977) и Чамли и др. (Chumley et al., 1979). Сводные данные о типах мутаций, а также их обозначения и положения на карте в случае *E. coli* можно найти в обзоре Бахман и Лоу (Bachman, Low, 1980), а в случае *S. typhimurium* — в работе Сандерсона и Хартмана (Sanderson, Hartman, 1978).

Основная система. Каждому бактериальному штамму независимо от количества имеющихся у него мутаций приписывается определенный номер. Номер этот относится к определенному изоляту. На практике обозначение штамма состоит из двух заглавных букв (обозначающих соответствующую лабораторию) и номера, который является номером штамма в коллекции этой лаборатории. Например, штамм TR248 несет мутации *hisC*527 и *cysA*1349 и относится к коллекции Джона Рота. Для новых коллекций штаммов следует использовать такие сочетания двух букв, которые до этого не применялись.

Каждый мутантный локус обозначается символом, образованным тремя буквами (строчными, набранными курсивом). Обычно их выбирают, исходя из явного фенотипа мутанта или



В 1980 г. начались работы по расширению старой лаборатории Колд-Спринг-Харбор по проекту фирмы «Мур Гровер Харпер» из Эссекса, шт. Коннектикут. Весь этот комплекс назван Дельбрюковской лабораторией, что отражает как его историю, так и надежды на будущее генетических исследований. (На фотографии показан макет новых построек.)

метода отбора. (Например, мутации, влияющие на биосинтез гистидина, обозначаются *his*). Для обозначения индивидуального гена, находящегося в этом локусе или влияющего на этот процесс, после трехбуквенного символа локуса ставят заглавную букву. (Например, ген *hisC* кодирует трансаминазу, которая участвует в биосинтезе гистидина.)

Индивидуальные мутации обозначаются серией номеров. Для каждого обозначенного тремя буквами локуса используют свою серию номеров. (Например, *hisC*527 относится к одной частной мутации в локусе *his*. Эта мутация затрагивает ген *hisC*. Никакая другая мутация в локусе *his* независимо от того, какой ген в этом локусе она затрагивает, не может носить номер 527.)

Часто бывает необходимо обозначить фенотип штамма, причем сделать это надо так, чтобы обозначение фенотипа можно было отличить от обозначения генотипа. Фенотип сокращенно обозначают тем же символом из трех букв, но набранным прямым шрифтом и начинающимся с прописной буквы. Например,

штамм TR251 (*hisC*527 *cysA*1349 *supD*) является штаммом Cys^+Hys^+ (фенотип), так как супрессор *supD* исправляет ауксотрофность обеих мутаций *cysA* и *hisC*.

Существование транспонируемых элементов (транспозонов) приводит к необходимости введения дополнительных правил. Вставки (инсерционные мутации) обозначают теми же тремя буквами, символами генов и номерами аллелей, как это было описано выше. К этому добавляют символ, обозначающий встроенный материал. Символ этот ставится после двух двоеточий. (Например, *hisC*8691 : : Tn*10* обозначает определенную вставку сообщающего лекарственную устойчивость транспозона Tn*10* в ген *hisC*; этой мутации дан номер *8691* аллеля *his*.) В символе транспонируемого элемента две прописные буквы обозначают тип элемента. Простые последовательности-вставки, которые содержат лишь гены, участвующие в транспозиции, обозначают IS. Более сложные транспозоны, включающие дополнительные гены, например гены устойчивости к лекарственному препарату, обозначаются Tn.

Выделено много вставок (включений, инсерций) Tn*10*, о которых известны лишь их положения на карте, но неизвестны те гены, которые мутировали в результате вставки транспозона. Большинство их выделено как вставки вблизи какого-нибудь исследуемого гена (см. эксперимент 2). Чтобы можно было обозначать вставки Tn*10* в соответствии с их положением на карте и тогда, когда остается неизвестным, в каком именно гене произошла вставка, сделанное ранее Хонгом и Эймсом (Hong, Ames, 1971) предложение было видоизменено. Все такие вставки обозначают символом из трех букв, который начинается с буквы *z*. Вторая и третья буквы символа обозначают приблизительное положение вставки на карте в минутах. Вторая буква обозначает тот сегмент длиной 10 мин, в который попадает вставка. Сегменты эти нумеруются по часовой стрелке от минуты 0 (a=0—10, b=10—20, c=20—30 и т. д.). Третья буква точно таким же образом обозначает уже минуты карты внутри этих сегментов длиной в 10 мин. Например, вставка Tn*10*, локализованная вблизи гена *hisW* между минутами 47 и 48 генетической карты, обозначается как *zeh*-754 : : Tn*10*; вставка Tn*10* вблизи локуса *his* на 44-й минуте обозначается как *zee*-2 : : Tn*10*. Номера аллелей приписываются таким вставкам последовательно независимо от второй и третьей букв символа. Таким образом, если более точное картирование приведет к необходимости изменить трехбуквенный символ вставки, то номер вставки все равно не изменится. В соответствии с этим правилом используются обозначения от *zaa* до *zjj*. Для обозначения вставок во внехромосомных элементах мы используем буквы *zz*, за которыми следует буква, обозначающая внехромосомный элемент. Символом *zzf* обозначаются вставки в плазмиде F′.

Литература

Bachman B. J., Low K. B., 1980. Linkage map of *Escherichia coli* K12, Microbiol. Rev., **44**, 1.
Campbell A., Berg D., Botstein D., Lederberg E., Novick R., Starlinger P., Szybalski W., 1977. Nomenclature of transposable elements in prokaryotes. In: DNA insertion elements, plasmids, and episomes (Bukhari A. I. et al., eds.), p. 15, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
Chumley F. G., Menzel R., Roth J. R., 1979. Hfr formation directed by Tn*10*, Genetics, **91**, 639.
Demerec M., Adelberg E. A., Clark A. J., Hartman P., 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics, Genetics, **54**, 61.
Hong J.-S., Ames B. N., 1971. Localized mutagenesis of any specific small region of the bacterial chromosome, Proc. Natl. Acad. Sci., **68**, 3158.
Sanderson K. E., Hartman P. E., 1978. Linkage map of *Salmonella typhimurium*, Microbiol. Rev., **42**, 471.

Список штаммов

Все штаммы, кроме обозначенных особо, являются штаммами *Salmonella typhimurium.*

Эксперимент 1 NK337 *hisC*527 *leu*-414 *supE* (P22 *c2*ts29 *12*amN11 *13*amH101 *int*-3 Tn*10*)
LT2

Эксперимент 2 TR 5989 (*purB*12)
Пул клонов с транспозициями Tn*10* (10 000)
P22 (HT, *int*⁻)

Эксперимент 3 TT1127 (*hisC*8667 : : Tn*10*, ориентация B)
TT1151 (*hisC*8691 : : Tn*10*, ориентация A)
TT513 (*zee*-2 : : Tn*10*, ориентация A)

Эксперимент 4 TT5371 (*zeh*-754 : : Tn*10*); частота контрансдукции Tn*10* с *hisW* составляет 90%.
Фаг P22 (HT, *int*⁻), выращенный на TT5371 и мутагенизированный
Клетки LT2

Эксперименты 5 и 6 DB4383 (*E. coli*) *sup*° *gal*-1 *gal*-2 Sm^R *lac*⁻ Amp^R
DB6430 (*E. coli*) *argE*am $Rif^R/Nal^R\Delta$(*lac pro*)
DB6431 = DB6430 *metB*⁻ *supD* (*su*1⁺, вставляет серин)
DB6432 = DB6430 *metB*⁻ *supE* (*su*2⁺, вставляет глутамин)
DB6433 = DB6430 *metB*⁻ *supF* (*su*3⁺, вставляет тирозин, называется также *tyrT*)
DB6434 = DB6430 *metB*⁺ *supP* (*su*6⁺, вставляет лейцин)
DB6435 = DB6430 *met*B⁻ *supG* (*su*5⁺, вставляет лизин)
DB6436 = DB6430 *metB*⁻ *supB* (вставляет глутамин)
DB6437 = DB6430 *metB*⁻ *supC* (вставляет тирозин)
λ*amp* = λ*c*1857 *b*515 *b*519 *int*am29 Tn*2*
λ*c*I1857 *b*515 *b*519 *nin*5 *int*am29
BNN45 (см. эксперимент 8)
λ*c*I1857 ind⁺

Эксперимент 7

Точковые мутанты his

TB5583 *hisO*9657 (*hisG*1102, *hisT*1504)
TR5601 *hisO*9675 (*hisG*1102, *hisT*1504)
TR5589 *hisO*9663 (*hisG*1102, *hisT*1504)
TR5611 *hisO*9685 (*hisG*1102, *hisT*1504)
TR2895 *hisG*6570 (*hisO*1242)
TR2765 *hisG*6434 (*hisO*1242)
TR5063 *hisG*8642
TR6004 *hisG*708
TR5105 *hisG*8663 (*hisO*1242)
TR6005 *hisG*575
TR6006 *hisG*3037
TR6007 *hisG*572
TR6008 *hisG*460
TR6009 *hisG*2779
TR6010 *hisD*497
TR6088 *hisD*2578
TR6012 *hisD*3018
TR6013 *hisD*3794
TR6014 *hisD*3009 (*ara*-9)
TR1626 *hisD*3052 (*uvr*B)
TR6015 *hisD*492
TR6016 *hisD*113
TR6017 *hisD*10
TR6089 *hisD*476
LT2 дикий тип
P22 (HT, *int*$^-$)

Делеционные мутанты his

TR5557 *his*-9615 (*hisG*1102, *hisT*1504)
TR5991 *his*-2321
TR5558 *his*-9616 (*hisG*1102, *hisT*1504)
TR5561 *his*-9619 (*hisG*1102, *hisT*1504)
TR5992 *his*-203
TR5993 *his*-1380
TR3067 *his*-8443
TR3321 *his*-8475
TR3456 *his*-8495
TR3335 *his*-8473 (*dhuA*1)
TR3325 *his*-8477
TR3320 *his*-8479 (*edd*)
TR5994 *his*-4902
TR6003 *his*-2236 (*hisO*1242)
TR5995 *his*-646
TR5996 *his*-2228
TR2880 *his*-6555
TR5999 *his*-712
TR6000 *his*-152
TR6001 *his*-2630
TR6002 *his*-129
TR2864 *his*-6539 (*hisO*1242)
TR5997 *his*-2225
TR5998 *his*-3050

Все приведенные выше *his*-мутанты для роста на минимальной среде нуждаются лишь в гистидине. В скобках указаны дополнительные мутации (ни одна из них не приводит к ауксотрофности). Перед использованием каждый штамм нужно рассеять до отдельных колоний и проверить на потребность в гистидине. В качестве контролей используется донорный фаг, выращенный на LT2 (*his*$^+$, дикий тип) и TR5998 (*his*-3050, делеция всего оперона *his*). В качестве контрольного реципиента используйте также TR5998. В качестве дополнительного контрольного реципиента можно использовать какой-нибудь неродственный ауксотроф (например, *purB*64 или *purF*145 из эксперимента 13); лизаты фагов, выращенных на всех донорных штаммах, должны образовывать рекомбинанты с этими ауксотрофами.

Эксперимент 8 λgt7-*ara*6
Пул гибридов λgt7c *Eco*R1-фрагментами ДНК *S. typhimurium*
λgt4-*lac*5
RD100 (*E. coli*) *hisB*463

BNN45 (*E. coli*) *hsdR*⁻ *hsdM*⁺ *supE*44 (*su*2⁺) *sup*F (*su*3⁺) B1⁻ *met*⁻

Эксперимент 9 λgt5-*lac*5, pBR322
BNN45 (см. эксперимент 8)

Эксперимент 10 См. эксперимент 7
RD101=*E. coli* HB101 (pBR322-*his*OGD)

Эксперимент 11 DB5681 (*E. coli*) *thi*-1 (B1⁻) *lop*-8 (суперпродуцент лигазы) (λ*imm*434 *c*I-ts *S*am7)

Эксперимент 12 HB101 (*E. coli*) *hsdR*⁻ *hsdM*⁻ *recA*13 *supE*44 (*su*2⁺) *lacZ*4 *leuB*6 *proA*2 *thi*-1 (B1⁻) Sm^R
RD102=HB101/λ (устойчив к адсорбции фага λ)
RD103=HB101 (pBR322)

Эксперимент 13

Штамм	Положение на карте, мин
TR5654 *strA*1 *thrA*9	0
TR5655 *strA*1 *leu*-485	3
TR5656 *strA*1 *proA*36	7
TR5657 *strA*1 *purE*8	12
TR5658 *strA*1 *pyrC*7	22
TR5659 *strA*1 *purB*13	25
TR5660 *strA*1 *pyrF*146	33
TR5662 *strA*1 *his*-2236	44
TR5663 *strA*1 *purF*145	49
TR5661 *strA*1 *aroC*5	49,5
TR5664 *strA*1 *cysA*533	52
TR5665 *strA*1 *cysC*519	60
TR5666 *strA*1 *serA*13	63
TR5667 *strA*1 *sysG*439	72
TR5668 *strA*1 *cysE*396	79
TR5669 *strA*1 *ilv*-508	83
TR5670 *strA*1 *metA*53	90
TR5688 *strA*1 *purA*155	93
TR5671 *strA*1 *pyrB*64	98
TT627 *pyrC*7 *strA*1/F'_{ts} 114 *lac*⁺ *zzf*-20 : : Tn*10* (ориентация A)	
TT628 *pyrC*7 *strA*1/F'_{ts} 114 *lac*⁺ *zzf*-21 : : Tn*10* (ориентация B)	
TT629 *pyrC*7 *strA*1/F'_{ts} 114 *lac*⁺ *zzf*-22 : : Tn*10* (ориентация A)	

Методика 3 P22 (HT, *int*⁻)

Методика 5 NK337 (см. эксперимент 1)
TR4368 *his*-644 (P22 *sieA*27)
P22-503 (*c1*-7 *12*amN114 *13*amH101)
TR248 *cysA*1349am *hisC*527am
TR251 *cysA*1349am *hisC*527am *supD* (*su1*$^+$)

Методика 7 См. эксперименты 5 и 6

Методика 9 λ*c*1857 *b*515 *b*519 *nin*5 *int*am29
λ*amp*=λ*c*I857 *b*515 *b*519 *int*am29 Tn2

Методика 11 DB5681 (см. эксперимент 11)
DB5683 (*E. coli*) *thi*-1 (B1$^-$) (λ*c*1857 *S*am7)

Методика 14 Подробное описание структур см. в приложении 92
λgt1-λB
λgt4-O
λgt5-*lac*5
λgt7-*ara*6
λgt7-*lac*5
λ607
λsep6-*lac*5, *lac*5
Харон 4
λ590
λ760
λgt30-Ec6
λgt40-λB

Методика 15 RD104 = *E. coli* C600 *hsdR*$^-$ *hsdM*$^-$
A: *E. coli* N205 *recA*$^-$ (λ*imm434* *c*I-ts *b*2 *red*3 *E*am4*S*am7)
B: *E. coli* N205 *recA*$^-$ (λ*imm*434 *c*I-ts *b*2 *red*3 *D*am15*S*am7)

Методика 16 SF8 (*E. coli*) *hsdR*$^-$ *hsdM*$^-$ *recB* *recC* *lop*-11 (суперпродуцент лигазы) *supE*44 (*su*2$^+$) *gal*-96 Sm^R *leu*B6 thi-1 (B1$^-$) *thr*$^-$
HB101 (см. эксперимент 12)
BNN45 (см. эксперимент 8)

Методика 17 RD102=HB101/λ (см. эксперимент 12)

Методика 18 HB101 (см. эксперимент 12)
RD102=HB101/λ (см. эксперимент 12)
BNN45 (см. эксперимент 8)
SF8 (см. методику 16)

Методика 19 BNN45 (см. эксперимент 8)
RD105 (*E. coli*) *trpC*9830

Методика 29 *E. coli* 594 (λ*pol*A *c*I857 *nin*5 *Q*am73 *S*am7)
E. coli E1150 (λ*W*am *E*am T4*lig* *c*1857 *nin*5 *S*am100)

Раздел I
ЭКСПЕРИМЕНТЫ

Эксперимент 1

Выделение вставок Tn*10*, приводящих к ауксотрофности

Введение

Транспонируемые элементы могут встраиваться во многие точки бактериальной хромосомы. Если сайт включения оказывается в пределах какого-либо гена бактерии, то линейная непрерывность этого гена нарушается и он инактивируется. При встраивании элемента лекарственной устойчивости в ген, кодирующий какой-нибудь фермент биосинтеза, получается мутант с двойственным фенотипом. Потеря способности к биосинтезу того или иного соединения приводит к потребности в соответствующем питательном веществе (ауксотрофности), а экспрессия встроенной генетической информации — к лекарственной устойчивости. Оба этих фенотипа обусловлены одной и той же вставкой и при последующих генетических манипуляциях оказываются полностью сцепленными (Kleckner et al., 1975).

Такие вставки и ауксотрофность представляют большую ценность для самых разнообразных генетических манипуляций с бактериями (Kleckner et al., 1977). Например, с их помощью можно избирательно ввести в интересующий нас штамм любой определенный маркер ауксотрофности. Для этого мутацию от донора со вставкой, вызвавшей ауксотрофность (например, от штамма *hisG*9436 : : Tn*10*, инсерционного мутанта $Tet^R His^-$), вводят в реципиент. Проводят отбор на наследование лекарственной устойчивости (положительный отбор). Каждый рекомбинант, получивший устойчивость (в результате обычной рекомбинации), обязательно должен приобрести и ауксотрофность донора. (Транспозиция происходит настолько редко по сравнению с рекомбинацией, что не вызывает осложнений.) Описано много примеров использования таких ауксотрофов со вставками (Kleckner et al., 1977; Chumley et al., 1979; Chumley and Roth, 1980; Schmid and Roth, 1980).

Заслуживает внимания то, каким образом возникают такие мутанты со вставками (инсерционные мутанты), так как они появляются с высокой частотой, хотя уровень мутагенеза, которому подвергаются клетки, оказывается чрезвычайно низким. Каждый из выделенных мутантов возникает в результате одного и только одного мутационного акта. По этой причине не происходит выделения мутантов с множественными повреждениями и таким образом обходится затруднение, возникающее при интенсивном химическом мутагенезе.

Обоснование и план эксперимента

В этом эксперименте транспозон Tn*10* (сообщающий устойчивость к тетрациклину) вводится в клетки *Salmonella* с помощью специально сконструированного фага P22 (Chan et al., 1972; Kleckner et al., 1975). Такой фаг содержит Tn*10*, а также несет мутации, блокирующие репликацию фага (*12*⁻), лизис (*13*⁻), репрессию (*c2*ts) и интеграцию (*int*⁻). Эти мутации фага препятствуют передаче донором реципиенту устойчивости к тетрациклину (Tet^R) любым обычным способом (т. е. посредством лизогенизирования или образования плазмиды). Поскольку в фаговой ДНК нет участков, гомологичных хромосоме реципиента, то наследование элемента Tn10 в результате обычной гомологичной рекомбинации также происходить не может. При таких условиях проводится отбор клеток, устойчивых к тетрациклину. Реципиент должен приобрести элемент Tn*10* в результате необычной, незаконной рекомбинации, т. е. в результате транспозиции его из хромосомы фага P22 в хромосому реципиента. Каждая колония трансдуктанта Tet^R представляет собой результат одного независимого акта транспозиции, и каждый трансдуктант содержит одну копию ДНК транспозона Tn*10* в каком-то своем сайте хромосомы. При используемых условиях такие трансдуктанты Tet^R возникают с частотой 1 на 10^5 зараженных клеток.

В реальном эксперименте мутант P22 Tc*10*, т. е. множественный мутант фага P22, несущий в своем геноме Tn*10* (Chan et al., 1972), смешивают с клетками и высевают на чашки с богатой средой, содержащей тетрациклин. Образовывать колонии способны лишь те клетки реципиента, которые получили Tn*10* (путем транспозиции). После того как эти колонии вырастут, их перепечатывают на чашки с богатой средой [LB (бульон Лурия — Бертани) + тетрациклин] и на чашки с минимальной средой (E + тетрациклин). Ауксотрофы выявляют, сравнивая эти чашки-реплики. Используемый в таком скрещивании фаг получают индукцией лизогенного штамма NK337, как это описано в методике 5. Там же описано, как определять титр этого дефектного фага.

Методика

Транспозиция Tn*10*

1. Смешайте фаг P22 (лизат клетки NK337) и клетки *Salmonella* дикого типа (штамм LT2) в таком соотношении, чтобы множественность заражения была меньше единицы. Инкубируйте, чтобы провести адсорбцию фага. Вылейте смесь на чашки со средой LB + тетрациклин (20 мкг/мл) + ЭГТА

(10 мМ). Высевайте столько клеток, чтобы получить около 100—200 колоний в расчете на одну чашку (см. методику 5). Приготовьте 15 таких чашек на одну группу. Инкубируйте чашки при 40°С до тех пор, пока не появятся колонии (около 24—36 ч).

Выявление ауксотрофов

2. Каждую трансдукционную чашку перепечатайте на чашку LB+тетрациклин (20 мкг/мл)+ЭГТА и на чашку Е+тетрациклин (10 мкг/мл). Инкубируйте при 37°С.
3. Сравните чашки-реплики с богатой средой и с минимальной средой. Выявив колонию, выросшую на богатой среде, но отсутствующую на чашке с минимальной средой, отберите ее уколом с чашки с богатой средой и рассейте штрихом до отдельных колоний на чашке Green+тетрациклин (без ЭГТА). Такие чашки с рассевом инкубируйте при 37°С.

Классификация ауксотрофов

4. Со штриха каждого потенциального ауксотрофа отберите уколом слабоокрашенную (чувствительную к фагу) колонию. По шаблону перенесите все такие колонии на отдельные ячейки на чашке Green+тетрациклин+ЭГТА. Инкубируйте чашки при 37°С.
5. Перепечатайте засеянную по шаблону чашку (чашки) с потенциальными ауксотрофами на 11 чашек с диагностическими средами (см. приложение 2), на чашку с минимальной средой и на чашку со средой Green+тетрациклин+ЭГТА. Все чашки инкубируйте при 37°С в течение 24—36 ч. Исходные чашки сохраните.
6. Просмотрите чашки-реплики. Определите вероятные потребности каждого ауксотрофа. Проведите повторную очистку ауксотрофов, рассеяв клетки с чашки-реплики с богатой средой (Green+тетрациклин+ЭГТА) до отдельных колоний. Затем из полученных отдельных колоний каждого ауксотрофа засейте пробирки по 2 мл жидкой культуры. Инкубируйте со встряхиванием при 37°С.

Проверка чувствительности к фагу и пищевых потребностей мутантов

7. Чтобы проверить чувствительность к фагу, нанесите штрихи культур каждого из потенциальных ауксотрофов на чашку Green+тетрациклин (без ЭГТА) и поперек этих штрихов нанесите штрих фага P22. На отдельных чашках с минимальной средой разотрите 0,1 мл каждой культуры. На эти чашки добавьте по несколько кристалликов того необходимого питательного вещества, которое было выявлено с помощью диагностических сред.

8. Просмотрите результаты тестов на чувствительность к фагу и тестов с кристалликами питательных веществ. Все те ауксотрофы, которые чувствительны к фагу и которые отвечают на идентифицированное питательное вещество, можно закладывать на хранение. Приготовьте столбик с культурой для длительного хранения и занесите штамм в журнал.

Обсуждение

1. Для инъецирования своей ДНК в бактериальную клетку фагу P22 необходим кальций. ЭГТА образует комплексы с кальцием и тем самым препятствует размножению фага. В данном эксперименте выход чувствительных к фагу трансдуктантов повышается в результате того, что предотвращены повторные циклы развития фага на чашке. Предадсорбция необходима, чтобы фаговая ДНК могла быть инъецирована до того, как клетки окажутся на чашке с ЭГТА. Используемый фаг несет мутацию *c*2ts, так что высокая температура препятствует установлению репрессии. Поэтому чашки, на которые высевается трансдукционная смесь, инкубируют при 40°C.
2. ЭГТА добавляют в среду для того, чтобы предотвратить заражение чувствительных к фагу клеток каким-либо жизнеспособным фагом, оказавшимся на трансдукционной чашке.
3. Можно проводить сравнение чашек с богатой и минимальной средой, держа их против света друг над другом. Обычно ауксотрофы хорошо растут на богатой среде, но на чашке с минимальной средой дают лишь очень слабый отпечаток. В опытах с фагом P22, размножающимся в клетках *Salmonella*, часто используют индикаторные чашки Green (описание см. в приложении 1) (Levine, Curtiss, 1961). Колонии тех бактерий, в которых активно размножается фаг P22, приобретают на таких чашках темно-зеленую окраску. Колонии незараженных клеток (и устойчиво лизогенных клеток) оказываются бледноокрашенными. Эта среда представляет собой по существу богатую среду с индикатором pH и высокой концентрацией глюкозы. При штриховании используют чашки без ЭГТА, чтобы можно было выявить зараженные фагом колонии.
4. На чашке со штрихами не трогайте темно-зеленые зараженные колонии. Отбирайте уколом лишь хорошо изолированные слабоокрашенные колонии. В приложении 11 показано, как расположить колонии на чашке по шаблону. Чтобы не было перекрестного загрязнения ячеек, матрицы при перепечатывании иглы штампа должны быть довольно небольшими.
5. Состав 11 диагностических сред приведен в приложении 2. Каждое питательное вещество входит в состав двух таких

сред. Например, серин присутствует в среде 2 (ее состав перечислен по вертикали) и в среде 10 (состав перечислен по горизонтали). Таким образом, мутант, который растет только на средах 2 и 10, нуждается, вероятно, в серине.

6. Каждый ауксотроф должен расти на двух диагностических средах (см. выше). Исключение составляют ауксотрофы с множественными потребностями — это, например, мутанты, нуждающиеся одновременно в изолейцине и валине (растут только на среде 7), и мутанты, нуждающиеся одновременно во всех ароматических аминокислотах (растут только на среде 8). Среда 11 содержит набор таких питательных веществ, которых нет в других средах. В основном это витамины. Те мутанты, которые растут лишь на среде 11, нужно проверять на способность расти в присутствии каждого из этих компонентов по отдельности. (См. приложение 2.)
7. Пипетку на 0,1 мл погружают в суспензию фага P22 (*c*2) (образующего прозрачные пятна) с титром 10^8/мл. Затем этой пипеткой проводят штрих по поверхности индикаторной чашки Green и ждут, чтобы влага впиталась. После того как штрих фага высохнет, поперек него параллельными штрихами, пользуясь стерильными деревянными палочками или петлей, наносят культуры бактерий. Чашки инкубируют при 37°С.
8. Методы хранения бактериальных штаммов описаны в приложении 3. Правила обозначения мутаций и штаммов приведены во введении.

Литература

Chan R. K., Botstein D., Watanabe T., Ogata Y., 1972. Spezialized transduction of tetracycline resistance by phage P22 in *Salmonella typhimurium.* II. Properties of a high-frequency-transducing lysate, Virology, **50**, 833.

Chumley F., Roth J. R., 1980. Rearrangement of the bacterial chromosome using Tn*10* as a region of homology, Genetics, **94**, 1.

Chumley F., Manzel R., Roth J. R., 1979. Hfr formation directed by Tn*10*, Genetics, **91**, 639.

Kleckner N., Roth J. R., Botstein D., 1977. Genetic engineering in vivo using translocatable drugresistance elements. J. Mol. Biol., **116**, 125.

Kleckner N., Chan R., Tye B.-K., Botstein D., 1975. Mutagenesis by insertion of a drug-resistance element carrying an inverted repetition, J. Mol. Biol., **97**, 561.

Levine M., Curtiss R., 1961. Genetic fine structure of the c region and the linkage map of phage P22, Genetics, **46**, 1573.

Schmid M., Roth J. R., 1980. Circularization of transduced fragments: A mechanism for adding segments to the bacterial chromosome, Genetics, **94**, 15.

Эксперимент 2

Выделение вставок Tn*10* вблизи определенных генов

Введение

Часто бывает очень удобно, если вблизи интересующего нас гена находится какой-нибудь генетический маркер. Наличие такого маркера позволяет избирательно перемещать этот ген в другое генетическое окружение. Такой маркер можно использовать и при локализованном мутагенезе (см. эксперимент 4). Элементы, сообщающие устойчивость к лекарственным препаратам, можно использовать для получения такого селектируемого маркера почти в любой точке хромосомы. Предлагаемый эксперимент состоит в выделении вставок Tn*10* вблизи, но не внутри определенной интересующей нас области (гена *purB*).

Обоснование и план эксперимента

Набор клонов со случайными транспозициями Tn*10* получают в точности так, как это описано в эксперименте 1. Смешивают примерно 2000—5000 таких клонов и на такой смеси инсерционных мутантов бактерий выращивают фаг, осуществляющий неспецифическую трансдукцию. Затем полученным препаратом фага трансдуцируют какой-нибудь мутант по интересующей области. Проводят отбор клеток, у которых восстановлена мутантная функция (в данном случае отбирают клетки с замещенной областью *purB*). Каждый трансдуцированный фрагмент получен от донорной клетки, которая в какой-то точке хромосомы содержала Tn*10*. Вероятность того, что переданный при трансдукции фрагмент хромосомы донора с геном *purB*$^+$ получен от клетки со вставкой Tn*10*, находящейся вблизи этой интересующей нас области, оказывается вполне удовлетворительной (около 0,01). В этом случае элемент Tn*10* может наследоваться вместе с селектируемой областью. В действительности от 0,01 до 0,001 трансдуктантов на самом деле оказываются устойчивыми к тетрациклину (Tet^R). Большинство из них должно нести вставку Tn*10* вблизи изучаемой области. (Некоторые могут быть двойными трансдуктантами, у которых элемент Tn*10* встроен в каком-то сайте, несцепленном с этой областью.)

Методика

Создание пула мутантов со вставками Tn*10*

1. Проведите транспозиционное скрещивание (как это описано в эксперименте 1). Используйте такие количества фага и

клеток, чтобы получить примерно 500 колоний трансдуктантов на чашку. Сделайте десять таких чашек. Инкубируйте их двое суток при 40°С.

2. В каждую чашку налейте по несколько миллилитров бульона LB с ЭГТА (10 мМ). Пользуясь стеклянным шпателем, суспендируйте колонии в этой жидкости и все суспензии слейте в один сосуд. Хорошо перемешайте. Разведите суспензию до примерно 10^8 клетка/мл в среде LB+ЭГТА+тетрациклин (10 мкг/мл). Инкубируйте в течение ночи при 37°С со встряхиванием.

Выращивание трансдуцирующего фага на пуле инсерционных мутантов

3. *Дважды* промойте культуру собранных вместе инсерционных мутантов со вставками. Для этого два раза отцентрифугируйте клетки, ресуспендируя их в среде Е. Промытой суспензией засейте 1,0 мл бульона LB, чтобы получить препарат лизата трансдуцирующего фага P22 (см. методику 3). Остаток промытого пула инсерционных мутантов сохраните.
4. Смешайте полученную свежую ночную культуру с 4,0 мл бульона с фагом P22 (среда LB, содержащая $5 \cdot 10^6$ БОЕ/мл фага P22; см. методику 3). Инкубируйте, встряхивая при 37°С в течение 5—18 ч до тех пор, пока не наступит лизис. Если лизиса не произойдет даже и через 18 ч, переходите к следующим этапам. Такой способ выращивания фага описан в методике 3.
5. Проведите центрифугирование, чтобы осадить клетки и их обломки. Надосадочную жидкость слейте в пробирку с 0,25 мл хлороформа. Энергично перемешайте в смесителе Vortex, чтобы простерилизовать лизат. Полученный лизат должен содержать 10^{10}—10^{11} БОЕ/мл.

Выделение мутантов со вставками Tn*10*

6. Вырастите культуру TR5989 (*purB*12).
7. Проведите трансдукционное скрещивание на среде Е, высевая 0,1 мл свежей ночной культуры TR5989 (*purB*12) и ряд объемов (0,01—0,1 мл) фага P22, выращенного на пуле мутантов со случайными вставками Tn*10*. Приготовьте около 10 таких чашек. Инкубируйте при 37°С до тех пор, пока колонии трансдуктантов не вырастут настолько, что их можно будет перепечатывать (36—48 ч).
8. Перепечатайте колонии с трансдукционных чашек на чашки Е+ЭГТА и на чашки Е+ЭГТА+тетрациклин (10 мкг/мл). Инкубируйте при 37°С столько времени, чтобы можно было сравнить рост на этих чашках (24—48 ч).
9. Выявите тех трансдуктантов, которые выросли и на чашке Е, и на чашке Е+тетрациклин. Отберите уколом трансдуктан-

тов с чашек, содержащих тетрациклин, и рассейте штрихом до отдельных колоний на индикаторные чашки Green+тетрациклин. Отберите и рассейте по возможности 10—20 таких трансдуктантов. Инкубируйте чашки со штрихами при 37°C до тех пор, пока колонии не вырастут настолько, что проявится их окраска (18—24 ч).

10. Из каждого штриха отберите уколом хорошо изолированную бледноокрашенную колонию и засейте ею небольшой объем среды LB (1,0 мл).
11. На чашку Green поперек штриха фага P22 (*c2*) нанесите штрихами каждую из полученных культур, чтобы проверить их чувствительность к фагу.

Проверка сцепления Tn10 с мутацией purB12

12. Вырастите культуру TR5989.
13. Используя фаги, выращенные на каждом из штаммов с предполагаемой вставкой Tn*10* вблизи *purB*, проведите трансдукцию клеток TR5989 (*purB*12) к устойчивости к тетрациклину. Смешивайте по 0,01—0,1 мл фага и 0,1 мл свежей ночной культуры TR5989 на поверхности чашек LB+тетрациклин (20 мкг/мл). Инкубируйте 24 ч при 37°C.
14. Каждую трансдукционную чашку перепечатайте на среду E+тетрациклин+ЭГТА и на среду E+аденин+тетрациклин+ЭГТА. Инкубируйте чашки-реплики при 37°C/(24—36 ч).
15. Подсчитайте долю трансдуктантов Tet^R, являющихся одновременно Ade^+. Заложите на хранение культуры тех штаммов, которые показали достаточно тесное сцепление (более чем 10% совместного наследования Ade^+ и Tet^R). Для этого вернитесь к той чашке, на которой сохранились исходные чувствительные к фагу штаммы с Tn*10*. Отберите клетки тех штаммов, у которых вставки Tn*10* оказались сцепленными с геном *purB*12, посейте их в столбики для хранения. Занесите эти штаммы в журнал с указанием процентов котрансдукции вставок Tn*10* с мутацией *purB*.

Обсуждение

1. Это можно сделать одновременно с проведением транспозиции в эксперименте 1.
2. Важно, чтобы во все среды, используемые для суспендирования и выращивания этих пулов, был добавлен ЭГТА. В этих средах содержится некоторое количество фага, и если не окажется ЭГТА, то он сможет размножаться. Смысл этого в том, чтобы во время подращивания пула возникали и персистировали чувствительные к фагу клоны. Полученный таким способом пул из примерно 10 000 клонов с транс-

позициями включен в набор штаммов. Его следует выращивать в присутствии ЭГТА и хранить при —70°С. При использовании его для размножения фага с ним следует обращаться так, как это описано ниже.

3. Проводят промывки, чтобы удалить ЭГТА из препарата, используемого для размножения трансдуцирующего фага P22 на пуле клеток. Среду Е применяют потому, что она содержит кальций. Вероятно, можно применять и любой другой буфер с кальцием. Суспензию промытых клеток можно хранить при низкой температуре и позднее использовать ее как источник мутантов (методы хранения см. в приложении 3). Используемый в этом и в других экспериментах по общей трансдукции штамм фага P22 несет две мутации: мутацию *int⁻* (предотвращает интеграцию и образование стабильных лизогенных бактерий) (Smith, Levine, 1967) и мутацию HT (обусловливает повышенную частоту упаковки в фаг хромосомы клетки-хозяина) (Schmieger, 1972). Эти мутации обеспечивают высокие частоты трансдукции и позволяют получать трансдуктантов, не являющихся лизогенными по фагу P22. На этой стадии пул мутантов, несущих вставки, можно заморозить, чтобы использовать его в будущем (см. приложение 3).
4. Фаг P22 в бульоне (см. методику 3) вполне стабилен даже при комнатной температуре, но обычно его хранят при 4°С. Лизис при размножении фага можно обнаружить по просветлению культуры или по появлению нитей обломков клеток. Даже если и не заметно видимых признаков лизиса, все равно таким способом получаются препараты фага, пригодные для использования.
5. После перемешивания с хлороформом в смесителе Vortex суспензию лучше оставить при комнатной температуре на несколько часов или на ночь, чтобы повысить гибель клеток от хлороформа. После этого суспензию (с хлороформом) следует хранить при 4°С.
6. (Этап 7); используют несколько концентраций фага, чтобы компенсировать непостоянство титра фага в донорном лизате и вариации в эффективности трансдукции штамма-реципиента.
7. (Этап 8); важно, чтобы на этих чашках-репликах сохранились селективные условия (среда Е), так как в противном случае сможет расти исходный реципиентный штамм TR5989 (*purB*12).
8. (Этап 9); чтобы снизить вероятность получения нелизогенных чувствительных к фагу трансдуктантов, очистку трансдуктантов следует проводить по возможности сразу после того, как они четко выявятся. Необходимо проводить очистку нескольких колоний Tet^R, так как некоторые из них мо-

гут оказаться двойными трансдуктантами, у которых вставка Tn*10* не сцеплена с геном *purB*. Другие могут проявить лишь слабое сцепление с геном *purB*.

9. (Этап 10); колонии, в которых активно размножается фаг P22, должны быть темно-зелеными, нелизогенные штаммы — светлыми (бледно-зелеными). Стабильные лизогенные штаммы должны быть слегка темнее нелизогенных, но достоверно разглядеть это различие трудно.
10. (Этап 15); на этой стадии полезно сохранить два трансдуктанта: одного, несущего *purB*$^+$ и Tn*10*, и другого — мутацию *purB*12 и Tn*10*. Оба могут пригодиться при конструировании штаммов. Можно выделить лизогенную пару штаммов (*purB*12 и *purB*$^+$), сохранив при последнем тесте на сцепленность по одному трансдуктанту каждого типа; оба штамма будут содержать Tn*10* вблизи гена *purB*.

Литература

Schmieger H., 1972. Prage P22 mutants with increased or decreased transduction abilities, Mol. Gen. Genet., **119**, 75.

Smith H. O., Levine H., 1967. A phage P22 gene controlling integration of prophage, Virology, **31**, 207.

Эксперимент 3

Делеции, вызванные элементом Tn*10*

Введение

Одним из свойств последовательностей-вставок (IS-элементов) и транспонируемых элементов, обусловливающих устойчивость к лекарственным препаратам, является их способность вызывать образование делеций (и других перестроек) (Kleckner et al., 1979; Ross et al., 1979). Исходя из этого свойства, можно получать набор делеций в интересующей области. Наличие таких делеций можно использовать для генетического картирования, а также просто применять в качестве стабильных (неревертирующих) генетических маркеров при отборе.

Обоснование и план эксперимента

При многих перестройках, индуцированных Tn*10*, происходит утрата детерминант устойчивости к лекарственным препаратам. Поэтому если взять штамм, содержащий вставку Tn*10* в интересующей нас области, и проводить отбор клеток, утративших лекарственную устойчивость, то можно получить популяцию, сильно обогащенную делециями (или инверсиями) вблизи исходного сайта локализации Tn*10*.

Такой эксперимент проще провести, если использовать метод отбора, разработанный недавно Бохнером и др. (Bochner et al., 1980). Метод этот позволяет проводить прямой отбор клеток, чувствительных к тетрациклину. С помощью этого метода легко можно получить популяцию спонтанных мутантов, а уже затем проверять их на наличие делеций желаемого типа. В основе этого метода отбора лежит предположение (не доказанное), что тетрациклин проникает в клетки с помощью механизма, предназначенного для транспорта железа; эта система транспорта может блокироваться индуцибельным детерминантом устойчивости Tn*10*. Когда система поглощения железа блокирована, клетки оказываются неспособными расти на среде с низкими концентрациями железа. Добавляя в среду соединения, захватывающие железо, можно сделать рост полностью индуцированных клеток Tet^R зависимым от железа, добавляемого извне.

Описанный ниже эксперимент включает поиск делеций, вызываемых Tn*10*, встроенным вблизи *his*-оперона. Кроме делеций могут встречаться и инверсии, которые препятствуют экспрессии гена *hisD*, либо нарушая целостность кодирующей последовательности этого гена, либо отделяя ген *hisD* от его промотора.

Трансдукционные скрещивания с донорным фагом, выращенным на ряде точковых мутантов, позволяют выявить, действительно ли произошла делеция, и определить размер удаленного при этом участка гена *hisD*.

Методика

Отбор мутантов, чувствительных к тетрациклину (Tet^S)

1. Вырастите культуры:
   TT1151 (*hisC*8691 : : Tn*10*, ориентация А),
   TT1127 (*hisC*8667 : : Tn*10* ориентация В) *или*
   TT513 (*zee*=2 : : Tn*10*, ориентация А).
2. Разведите культуру 1 : 100 примерно до $2 \cdot 10^7$ клетка/мл. Высейте около $1 \cdot 10^6$ клеток (0,05 мл) на чашку со средой Бохнера. Для каждого штамма приготовьте около пяти таких ча-

шек, варьируя количество высеянных на чашку клеток от $5 \cdot 10^5$ до $5 \cdot 10^6$. Инкубируйте в течение 24—36 ч при 37°С.

3. Отберите уколом колонии с этих селективных чашек и рассейте штрихом до отдельных колоний на чашках со средой Бохнера.

Выявление мутантов hisD

4. Отдельные колонии перепечатайте по шаблону на чашки (около 200 колоний). Инкубируйте засеянные по шаблону чашки в течение ночи при 37°С.
5. Перепечатайте чашки, засеянные по шаблону, на пять сред: Е; Е+гистидин; Е+гистидин+тетрациклин; Е+гистидинол и LB. Инкубируйте в течение ночи при 37°С.
6. Выявите мутантов, чувствительных к тетрациклину и неспособных расти на среде с гистидинолом (*hisD*⁻). Отберите уколом таких *hisD*-мутантов Tet^S и рассейте их для получения отдельных колоний на чашках с питательной средой (без тетрациклина). В случае штамма ТТ513 сохраните также такие колонии, которые растут на среде Е+гистидинол, но не растут на минимальной среде

Характеристика новых мутантов hisD

7. Посейте жидкие культуры из отдельных колоний новых мутантов *his*.
8. Разотрите по 0,1 мл культур мутантов на чашках Е+низкая концентрация гистидина. После того как жидкость впитается, нанесите капли лизатов картирующих фагов, выращенных на серии точковых *his*-мутантов (см. эксперимент 7). Чашки не переворачивайте. Инкубируйте при 37°С.
9. Просмотрите результаты картирующих скрещиваний.
10. Сохраните все охарактеризованные делеционные или инверсионные мутанты, заложив их в столбики. Занесите их в журнал.

Обсуждение

1. В штамме ТТ513 вставка Tn*10* находится вне оперона со стороны его промотора. Штаммы ТТ1151 и ТТ1127 содержат вставки Tn*10* внутри гена *hisC*, который находится непосредственно рядом с геном *hisD* ближе к промотору.
2. Отбор будет происходить лишь в том случае, если на чашку высевать небольшое количество клеток (10^6 или менее). Отбор не будет происходить в присутствии избытка ионов железа или марганца. Поэтому следует обратить особое внимание на приготовление среды.
3. Выделение отдельных колоний проводят для того, чтобы освободиться от фона родительских клеток. Такие родитель-

ские клетки способны расти на тех средах, которые будут использованы при проверке на ауксотрофность.

4. (Этап 5); содержащие искомые перестройки штаммы будут расти на среде E+гистидин, но не на среде E+гистидин+тетрациклин или на среде E+гистидинол. Большинство таких перестроек будет делециями, но некоторые могут оказаться и инверсиями. В штамме TT513 инверсия с точкой разрыва внутри оперона, но дистальнее гена *hisD* должна привести к ауксотрофности по гистидину, но при этом должна сохраниться способность использовать гистидинол в качестве источника гистидина (*hisD*+).
5. (Этапы 7 и 8); эти скрещивания по картированию делеций следует проводить так, как описано в эксперименте 7.
6. (Этапы 6 и 9); интерпретация результатов. В случае штамма TT513 (Tn*10* вне промотора и оперона) любая делеция, повреждающая промотор *his*-оперона, приведет к фенотипу His⁻ и к неспособности использовать гистидинол, даже если ген *hisD* и остается интактным. Полученные из клеток TT513 штаммы с инверсиями будут *his*-ауксотрофами, если точки разрыва попадают внутрь этого оперона. Если точка разрыва находится между промотором *his*-оперона и дистальным концом гена *hisD*, то они будут неспособны использовать гистидинол. Они могут использовать гистидинол лишь в том случае, если точка разрыва при образовании инверсии находится от промотора дистальнее гена *hisD*.

Если исходить из штамма со вставкой в гене *his*C, то мутанты с делециями, распространяющимися на промотор (или удаляющими его), будут неспособны использовать гистидинол. Мутанты же с инверсиями, точки разрыва которых находятся между промотором *his*-оперона и дистальным в отношении промотора концом гена *hisD*, также будут неспособны использовать гистидинол.

При картирующих скрещиваниях делеции не могут давать рекомбинантов с целым рядом последовательно расположенных точковых мутаций. Инверсии могут рекомбинировать со всеми точковыми мутациями, за исключением тех, которые расположены непосредственно рядом с точкой разрыва. Инверсии неспособны давать рекомбинантов His+ при скрещивании с делециями, удаляющими хотя бы одну из точек разрыва. Можете сами проверить эти утверждения, нарисовав соответствующие схемы.

Литература

Bochner B., Huang H.-C., Schieven G., Ames B. N., 1980. Positive selections for loss of tetracycline resistance, J. Bacteriol., **143**, 926.

Kleckner N., Reichart K., Botstein D., 1979. Inversions and deletions of the *Salmonella* chromosome generated by the translocatable tetracycline-resistance element, J. Mol. Biol., **127**, 89.
Ross D., Swan J., Kleckner N., 1979. Physical structures of Tn*10*-promoted deletions and inversions, Role of 1400 bp inverted repetitions, Cell, **16**, 721.

Эксперимент 4

Локализованный мутагенез

Введение

Когда известно положение изучаемого гена в хромосоме, часто бывает полезно уметь получать вблизи этого гена новые мутации. Как это сделать, предложили Хонг и Эймс (Hong, Ames, 1971). Они мутагенизировали суспензию фага P22, который осуществлял общую трансдукцию, и такой суспензией проводили трансдукцию, отбирая при этом те клетки, в которых ген донора встроился вблизи исследуемой области. Каждый встроившийся фрагмент хромосомы донора включает также и соседний сильно мутагенизированный сегмент хромосомы. Поэтому вероятность приобретения трансдуктантами мутаций в генах, тесно сцепленных с селектируемым маркером, оказывается высокой. Поскольку мутагеном обрабатывался лишь незначительный участок хромосомы в частице фага, то вероятность множественных мутаций оказывается гораздо ниже, чем при обычных методах мутагенеза. (Однако можно столкнуться с множественными мутациями в трансдуцируемой области.) Использование элементов лекарственной устойчивости расширяет границы применения этого метода. Избрав в качестве селектируемого маркера устойчивость к тетрациклину, можно сильно мутагенизировать область хромосомы вблизи любой вставки Tn*10*. Поскольку этот селектируемый маркер (т. е. устойчивость к тетрациклину) можно поместить рядом с любым интересующим нас геном (см. эксперимент 2), то такую методику можно применять в отношении любой области хромосомы.

Обоснование и план эксперимента

В этом эксперименте фаг P22 (HT, *int*⁻) выращивают на штамме, несущем вставку Tn*10* вблизи жизненно важного гена

hisW на 47-й минуте карты *Salmonella* (Anton, 1968; Brenchley, Ingraham, 1973). По этому гену получены чувствительные к холоду условно-летальные мутации. Такие мутанты при пермиссивной температуре оказываются конститутивными по *his*-оперону. Задача заключается в том, чтобы посредством локального мутагенеза этой области получить условно-летальную мутацию, чувствительную к повышению температуры. Препарат фага следует обработать гидроксиламином, как это описано в методике 8. Этот мутагенизированный препарат фага используется затем для трансдукции элемента Tn*10* (т. е. устойчивости к тетрациклину) в реципиент дикого типа (LT2). После этого следует проверка трансдуктантов на наличие температурочувствительной условно-летальной мутации или нелетальной конститутивной мутации *hisW*. Таких трансдуктантов можно идентифицировать по тому, что они образуют морщинистые колонии на чашках с 2%-ным раствором глюкозы (Murray, Hartman, 1972).

Методика

Мутагенез области hisW

1. Отдельной колонией штамма LT2 засейте небольшой объем среды (3 мл). Культуру инкубируйте при 37°С со встряхиванием.
2. По чашке Е+тетрациклин+2% глюкозы разотрите 0,1 мл клеток LT2 и 0,1 мл препарата фага, выращенного на штамме ТТ5371 (*hisW*+ *zeh*-754 : : Tn*10*) и сильно мутагенизированного гидроксиламином (см. методику 8). Приготовьте 10 таких чашек и инкубируйте их при 30°С до тех пор, пока не станут видны крохотные (как острие булавки) колонии (т. е. в течение 12—18 ч). После этого перенесите чашки на 40°С и продолжайте инкубацию, пока большинство колоний не станут большими.

Идентификация мутантов

3. Поищите на чашках крохотные колонии (потенциальные температурочувствительные мутанты) и морщинистые колонии (потенциальные конститутивные мутанты *hisW*). Отберите уколом крохотные колонии и рассейте штрихом до отдельных колоний на чашках Green+тетрациклин+ЭГТА. Инкубируйте чашки при 30°С. Отберите уколом морщинистые колонии и рассейте их штрихом на чашки Е+тетрациклин+ +2% глюкозы (по 6—8 рассевов на каждую чашку). Инкубируйте при 30°С.
4. Перепечатайте штрихи потенциальных температурочувствительных мутантов на три чашки Е+тетрациклин

(10 мкг/мл)+ЭГТА. Одну из этих чашек инкубируйте при 30°С, другую — при 37°С, а третью — при 41°С.

Со штрихов каждого потенциального конститутивного *his*-мутанта отберите уколом по слабоокрашенной морщинистой колонии и определите их чувствительность к фагу, а также сцепление фенотипа «морщинистые колонии» с устойчивостью к тетрациклину.

5. Посмотрите, как влияет температура на рост клеток на чашках-репликах. По возможности отберите уколом по две колонии со штриха каждого мутанта, рост которого четко подавляется при повышении температуры инкубации. Пересейте эти колонии штрихом на чашку со средой Green+тетрациклин. Инкубируйте чашки при 30°С.

Проверка фенотипа мутантов и их чувствительности к фагу

6. Из каждого штриха отберите уколом по бледноокрашенной (предположительно чувствительной к фагу) колонии. С помощью штампа отпечатайте их на главную чашку со средой Green+тетрациклин+ЭГТА. Эту главную чашку инкубируйте при 30°С.
7. Перепечатайте потенциальные температурочувствительные мутанты с главной чашки на чашки со средой E. Одну чашку-реплику инкубируйте при 25°С (комнатная температура), а другие — при 30, 37 и 40°С.
8. Через 24 ч посмотрите, как выросли колонии на этих чашках. Вырастите в питательном бульоне при 30°С культуры всех независимых проверенных температурочувствительных мутантов и всех мутантов, образующих морщинистые колонии.
9. С помощью перекрестного штрихования проверьте чувствительность мутантов к фагу. Если есть время, то проверьте сцепление полученной мутации с Tn*10*.
10. Заложите культуры на хранение и занесите в журнал все проверенные температурочувствительные мутанты и все мутанты, образующие морщинистые колонии.

Обсуждение

1. (Этап 2); суспензию фага следует обрабатывать мутагеном так, чтобы сохранялось всего лишь около 0,1% бляшкообразующих единиц. Так как при этом практически все мутации, имеющиеся в популяции, были индуцированы мутагеном в свободных фаговых частицах, то все выявленные в скрещиваниях трансдуктанты с мутациями могут считаться результатом независимых актов мутагенеза. В этом эксперименте мы исходим из того, что температурочувствительные мутанты будут образовывать колонии при 30°С, но не будут

продолжать расти после переноса чашки на высокую температуру. Поэтому после инкубации чашек при 40°С такие мутанты выявляются в виде крошечных колоний.

2. (Этап 3); все конститутивные *his*-мутанты образуют морщинистые колонии, если их выращивать на среде с высоким содержанием глюкозы (Murray, Hartman, 1972).
3. (Этап 4); чашки со стерильными пятнами перепечатывают на чашки-реплики, содержащие ЭГТА, чтобы предотвратить размножение фага и повысить вероятность выявления чувствительных к фагу нелизогенных рекомбинантов. Среда Green+тетрациклин+ЭГТА содержит 1% глюкозы и потому пригодна для выявления морщинистых колоний, образуемых конститутивными мутантами. Перепечатывая чашки со штрихами и просмотрев все изолированные колонии, можно обнаружить температурочувствительных мутантов даже в том случае, если в исходной колонии содержалось значительное количество ревертантов.
4. (Этап 5); повторный рассев до отдельных колоний проводится для того, чтобы очистить штамм от фага. Этот рассев проводят на чашках Green+тетрациклин без ЭГТА, что дает возможность разглядеть на них чувствительные к фагу колонии.
5. (Этап 7); чувствительность к температуре проверяют на минимальной среде, так как при этом получаются более четкие результаты. Это относится не ко всем мутантам, и чувствительность к температуре можно проверить и на богатой, и на бедной средах. Следует отметить, что в этом случае можно выявить также и температурочувствительные мутанты детерминанта устойчивости Tn*10*.

Литература

Anton D. N., 1968. Histidine regulatory mutants in *Salmonella typhimurium*. V. Two new classes of histidine regulatory mutants, J. Mol. Biol., **33**, 533.

Brenchley J. E., Ingraham J. L., 1973. Characterization of a cold-sensitive *hisW* mutant of *Salmonella typhimurium*, J. Bacteriol., **11**, 452.

Hong J.-S., Ames B. N., 1971. Localization mutagenesis of any specific small region of the bacterial chromosome, Proc. Natl. Acad. Sci., **68**, 3158.

Murray M. L., Hartman P. E., 1972. Overproduction of *hisH*- and *hisF*-gene products leads to inhibition of cell division in *Salmonella*, Clin. J. Microbiol., **1**, 867.

Эксперимент 5

Выделение и характеристика точковых мутантов фага λ, полученных с помощью гидроксиламина

Введение

Часто бывает необходимо получить мутацию в фаговом геноме какого-нибудь вектора или клона, не прибегая к скрещиваниям, которые могли бы внести нежелательную чужую информацию (например, сайты рестрикции). С другой стороны, часто бывает нужно получить мутации в клонированной чужеродной ДНК. Для этого используется та же самая методика; нужно лишь, чтобы функционирование встроенной ДНК приводило к такому фенотипу, который можно выявить. Мутации фага λ используются как внешние маркеры при скрещиваниях, проводимых при картировании мутаций в клонированном фрагменте, или как такие маркеры, которые дают уверенность, что рекомбинация произошла внутри клонированного фрагмента.

В качестве модели клонированного фрагмента мы используем ген ТЕМ-β-лактамазы, который оказался в фаге λ в результате встраивания перемещающегося элемента Tn*2*.

Обоснование и план эксперимента

Как индуцировать мутации в фаге λ гидроксиламином in vitro указано в методике 8. Это весьма обычный метод мутагенизирования как фага, так и выделенной в очищенном виде ДНК. Его преимущество заключается в высокой специфичности (индуцируются транзиции G⟶A) и большой эффективности. При работе с умеренным фагом контролировать эффективность мутагенеза очень просто — достаточно следить за появлением среди выжившего фага мутаций, приводящих к образованию прозрачных бляшек. По этой методике можно выделить амбер-мутантов фага λ. С помощью спот-теста на комплементацию (методика 10) их можно охарактеризовать по их комплементации с амбер-мутациями в большинстве известных генов фага λ. Комплементационный анализ позволит определить положение полученных мутаций на карте. Мутации по ТЕМ-β-лактамазе можно использовать для картирования делеционных мутантов в этой модели клонированного фрагмента (эксперимент 6).

Методика

1. Приготовьте для газона ночные культуры штаммов DB6430, DB6431 и DB4383 (и любых других желаемых супрессорных штаммов; см. список штаммов) в среде TYM.

2. Приготовьте культуры для газона. В данном случае культура для газона — это просто растущая экспоненциально культура плотностью около $5 \cdot 10^8$ клетка/мл. Определите титр препарата фага *λamp*. Для этого сделайте последовательные разведения препарата фага, смешайте 0,1 мл разведения с 0,2 мл культуры для газона, инкубируйте смесь 15 мин при комнатной температуре и высейте на чашку для фага λ или на чашку Red (методика 7). Инкубируйте чашки в течение ночи при 37 или 34°C.
3. Приступайте к обработке гидроксиламином (методика 8). Чтобы определить выживаемость и появление прозрачных бляшек в процессе обработки, отбирайте пробы и высевайте различные разведения их на чашки для фага λ при 34°C. Если хотите выявить амбер-мутации в генах фага λ, то обработанные мутагеном препараты высевайте также на газон штамма DB6431, который содержит супрессор амбер-мутаций (или на любой другой супрессорный штамм; см. список штаммов). Чтобы выявить мутации, приводящие к отсутствию β-лактамазы, высевайте на чашки Red (методика 7).
4. После того как определен титр обработанных мутагеном препаратов, высейте фаг на несколько чашек, чтобы получить на них достаточное количество мутантов.

Обсуждение

Помимо чашек Red существует несколько других способов выявлять наличие или отсутствие β-лактамазы. Один из них состоит в том, чтобы лизогенизировать испытуемым фагом какого-нибудь хозяина, а затем определять устойчивость полученной *лизогенной* бактерии к ампициллину. Это можно сделать полуколичественно, если использовать разные концентрации этого лекарственного препарата. Для этого испытуемый фаг нанесите штрихом на газон чувствительной к ампициллину (Amp^S) клетки-хозяина (например, BNN45) или просто нанесите каплю этого фага на газон. В данном конкретном случае фага *λamp* (который несет амбер-мутацию в гене *int*) клетка-хозяин должна содержать также супрессор *supE* или *supF*. Инкубируйте чашки в течение ночи при 34°C (фаг *λamp* обладает температурочувствительным репрессором *c*I857). На следующий день уколом зубочистки в центр пятна от капли или в центр бляшки (где находятся лизогенные бактерии) отберите лизогенные клетки и перенесите его на чашку LB+ампициллин, на чашку LB и (чтобы сохранить фаг) на чашку для фага λ с газоном любой чувствительной к фагу λ клетки-хозяина. На чашки LB и LB+ +ампициллин бактерий не добавляют, так как на них проверяют устойчивость лизогенных бактерий к ампициллину. А на

чашки с фагом λ высевают клетки в мягком агаре, так что *фаг* на них будет сохранен.

Второй метод заключается в том, что суспензию фага капают прямо на газон клеток Amp^S (например, BNN45) на чашке LB+ампициллин. Клетки в этом пятне вырастут лишь в том случае, если фаг может лизогенизировать и передавать устойчивость к ампициллину.

Третий метод состоит в использовании хромогенного субстрата с β-лактамовым кольцом (87/312 или нитроцефина). Им можно действовать непосредственно на бляшки или колонии.

Эксперимент 6

Выделение делеционных мутантов λ*amp*

Введение

Одно из основных достоинств фага λ в качестве клонирующего переносчика состоит в том, что очень легко можно отбирать делеционные мутации во встроенном в фаг λ фрагменте чужеродной ДНК. Используя делеционные мутации, можно быстро картировать основные структурные и функциональные особенности клонированной ДНК. Если есть много штаммов с различными концами делеций, то легко можно определить места промоторов, мРНК, расположение информации структурных генов и т. д.

Обоснование и план эксперимента

Фаг обрабатывают хелатирующим агентом (ЭДТА), вызывающим разрушение таких головок фага λ, которые содержат ДНК сверх определенного количества. Разрушающее действие ЭДТА зависит от условий, в частности от температуры. Поэтому можно подобрать такие условия, при которых после обработки ЭДТА выживают практически лишь делеционные мутанты. У большинства λ-векторов основная часть содержащейся у этого фага несущественной ДНК уже делетирована, и поэтому большинство отбираемых из клона делеций будут делециями, затрагивающими клонированную чужеродную ДНК.

Методика

Следуйте методике 9.

Обсуждение

Протяженность делеций можно определить несколькими способами. Первый из них заключается в том, что попарно скрещивают между собой фаги с различными делециями. Второй состоит в их картировании с помощью гетеродуплексного анализа. Третий заключается в том, чтобы испытать каждую делецию на способность рекомбинировать с точковыми мутациями и на основании этих данных построить карту делений. Если есть время, то можно попробовать все эти методы. Как проводить картирование, подробно описано в методике 10. Поскольку нас интересует ген β-лактамазы, то для выявления тех актов рекомбинации, которые привели к появлению устойчивости к ампициллину, можно использовать чашки Red (методика 7) или лизогенизацию с последующей проверкой на устойчивость к этому антибиотику.

Тест с использованием лизогенизации обладает наибольшей чувствительностью, и его можно провести следующим образом. Приготавливается λ-чашка с газоном BNN45, и на этот газон наносятся попарно друг на друга капли делеционных и (или) точковых мутантов Amp^S. Чашку инкубируют в течение ночи при 34°C. Клетки из центра каждого пятна переносят с помощью зубочисток на чашку LB+ампициллин и на чашку LB (служит контролем), чтобы проверить, образуются ли вообще лизогенные бактерии, устойчивые к ампициллину (Amp^R). Такие лизогенные бактерии будут образовываться лишь в том случае, если испытуемые фаги Amp^S могут рекомбинировать между собой.

Эксперимент 7

Картирование делеций

Введение

Скрещивания с использованием делеционных мутаций дают возможность наиболее достоверно определять расположение му-

тантных сайтов на генетической карте. Результаты блот-гибридизации с рестрикционными фрагментами показывают, затрагивают ли делеции отдельные конкретные рестрикционные сайты в ДНК. Сочетание этих двух методов позволяет грубо сопоставить генетическую и физическую карты исследуемой области. Такое сопоставление дает возможность сравнить фенотипические дефекты, характерные для отдельных мутаций, с изменениями определенных областей ДНК. Метод генетического картирования и многие использованные здесь мутанты описали Хартман и др. (см. обзор Hartman et al., 1971). Описана и более подробная карта гена *hisG* (Hoppe et al., 1979).

Обоснование и план эксперимента

Каждой группе нужно дать по пять делеционных *his*-мутантов *Salmonella*. Все эти делеции затрагивают первую треть *his*-оперона (*hisG, D, C*). Нужны также лизаты осуществляющего общую трансдукцию фага, выращенные на ряде точковых *his*-мутантов, причем лизаты с высоким титром. Для каждого делеционного мутанта следует провести спот-тест со всеми донорными фагами. Необходимо проверить способность каждого скрещивания давать рекомбинантов His+ (тест «да» или «нет»). Это позволит грубо определить положение на карте концов делеций. В эксперименте 10 с теми же делециями будут проведены блот-гибридизации. Совокупность полученных результатов позволит определить положение сайтов рестрикции на генетической карте и оценить физические размеры некоторых делеций.

Методика

1. Исходя из отдельных колоний, получите жидкие культуры каждого из делеционных *his*-мутантов и контрольного делеционного мутанта *purF*145 (TR5663) или *pyrB*64 (TR5671). (Эти неродственные ауксотрофы имеются среди штаммов, которые используются в эксперименте 13.)
2. Разотрите по 0,1 мл каждого мутанта по трем чашкам (E + 0,005 мМ гистидина). Подождите, чтобы жидкость полностью впиталась. На поверхность чашки скрещивания можно сразу нанести капли 25 разных препаратов фага, если пользоваться ящиком Бертани (матрицей), в ячейки которого внесены препараты набора донорных фагов. Делают это с помощью «паука» (штампа с 25 металлическими палочками). Пока капли не впитаются, чашки не переворачивайте. Если нет таких матриц, то капли фага можно аккуратно нанести на газон реципиента пипеткой. Инкубируйте чашки в течение двух суток при 37°C. Приготовьте одну чашку, содержа-

щую только фаги (т. е. нанесите их на чашку без бактерий-реципиентов).

3. Просмотрите чашки и выявите, в каких пятнах контакта донорного фага с газоном делеционного реципиента имеются рекомбинанты. Исходя из полученных данных, постройте по возможности более точную карту использованных мутаций. Если имеющиеся данные не позволяют построить однозначную карту, то следует повторить некоторые скрещивания с более высоким разрешением (нанося 0,1 мл суспензии фага и 0,1 мл ночной культуры на целую чашку).

Обсуждение

1. (Этап 2); среда для картирования делеций содержит низкую концентрацию гистидина, так что реципиенты могут расти в течение нескольких делений. В результате повышается количество трансдуктантов, а тем самым и разрешение картирующих скрещиваний. В качестве положительного контроля, показывающего эффективность применяемых фаголизатов, использован реципиент *pyr B* (или *pur F*). В качестве негативного контроля использован реципиент с делецией *his*-3050, в результате которой удаляется весь *his*-оперон. Такие картирующие скрещивания обладают повышенной чувствительностью, так как для трансдукции использован мутант фага P22. Этот мутант несет мутацию (HT), которая сильно повышает вероятность включения материала клетки-хозяина в головки фага (Schmieger, 1972). В лизате такого мутанта около половины фаговых частиц содержат ДНК клетки-хозяина (Susskind and Botstein, 1978). Те чашки, которые будут использоваться в скрещиваниях такого типа, полезно предварительно инкубировать в течение ночи при 37°C. Они подсохнут, и капли фага быстрее впитаются, что позволит избежать слияния нанесенных на чашку капель.
2. (Этап 3); если в пятнах на контрольной чашке нет колоний, то пятна скрещивания можно считать положительными (т. е. указывающими на то, что рекомбинация происходит), даже если в них оказалось лишь по одной колонии. Обычно такой слабый ответ нуждается в подтверждении, для чего проводят скрещивание на целой чашке (0,1 мл суспензии фага и 0,1 мл полностью выросшей жидкой культуры растирают по всей селективной чашке).

Литература

Hartman P., Hartman Z., Staht R., Ames B. N., 1971. Classification and mapping of spontaneous and induced mutations in the histidine operon of *Salmonella,* Adv. Genet., **16**, 1.

Hoppe I., Johnston H. M., Biek D., Roth J. R., 1979. A refined map of the *hisG* gene of *Salmonella typhimurium*, Genetics, **92**, 17.
Schmieger H., 1972. Prage P22 mutants with increased or decreased transduction abilities, Mol. Gen. Genet., **119**, 75.
Susskind M. M., Botstein D., 1978. Molecular genetics of bacteriophage P22, Microbiol. Rev., **42**, 385.

Эксперимент 8

Отбор клонов λgt-*his* по комплементации

Введение

Если гены, клонированные в векторе λ, экспрессируются в клетках *E. coli* и могут комплементировать генетический дефект клетки-хозяина, то содержащие их фаги можно отобрать из всего пула гибридов. Такой тест на комплементацию можно проводить двумя основными способами. Первый из них заключается в том, что образуют лизогенную бактерию с гибридным фагом. После этого проверяют способность полученной лизогенной бактерии расти на селективных средах. Однако у многих векторов λ удалены гены, нужные для лизогенизации. В этом случае можно использовать фаг-помощник для образования двойных лизогенов. Второй метод отбора определенных гибридов фага λ заключается в литической комплементации. Обычно фаг λ неспособен размножаться в такой клетке, которая не может расти из-за какого-нибудь генетического дефекта. Однако если инфицирующий фаг вносит в клетку такой ген, который комплементирует дефект клетки-хозяина, то клетка оказывается способной расти и поддерживать размножение этого фага. В конечном счете заразивший фаг убьет клетку и образуется бляшка.

Обоснование и план эксперимента

Пул гибридных фагов λ был создан в результате введения случайных *Eco*RI-фрагментов ДНК *S. typhimurium* в вектор λgt7. Таким образом было получено 250 000 независимо образованных гибридов. Фаг λ не способен заражать клетки *Salmonella*, но гены *Salmonella* экспрессируются в клетках *E. coli*. Заражая клетки *E. coli* His$^-$ такими фагами, можно провести тест на комплементацию. Чтобы провести отбор лизогенных бактерий, об-

разуют двойные лизогены, используя фаг-помощник λgt4-*lac*5. Этот фаг несет все гены, необходимые для лизогенизации. Он содержит также ген β-галактозидазы *E. coli*, так что его можно отличить от всех используемых гибридов. Этот фаг — помощник интеграции несет также температурочувствительную мутацию *c*I857 в гене λ-репрессора, что позволяет получать из лизогенных бактерий гибридный фаг, проводя индукцию температурой. Отбор лизогенных бактерий проводят, заражая клетки His⁻ смесью гибридных фагов и фага — помощника интеграции и высевая их на минимальные чашки без гистидина. Колонии, вырастающие на этих чашках, образованы клетками, которые содержат гибридный фаг, комплементирующий данный дефект клетки-хозяина. Эти клетки или содержат гибридный фаг, супрессирующий дефект His⁻, или просто являются ревертантами. Поскольку используются большие количества фага, то и в том и в другом случае колонии будут, вероятно, содержать фаг — помощник интеграции и один или несколько гибридных фагов. Чтобы отличить супрессию в результате комплементации от реверсии, из колоний, выросших на минимальных чашках, выделяют фаг. Для этого проводят термоиндукцию культуры, т. е. подращивают ее в течение короткого времени при 42°С. Гибридный фаг из этих клеток можно отличить от фага — помощника интеграции, проведя высев на чашки с Xgal (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозидом) — хромогенным субстратом β-галактозидазы. Гибриды образуют бесцветные бляшки, а помощник интеграции — голубые. Затем можно провести тест на комплементацию гибридного фага с исходным мутантом, а также и с другими мутантами.

Литическая комплементация гораздо проще. Клетки His⁻ заражают пулом гибридных фагов и высевают на минимальные чашки без гистидина. Тот фаг, который комплементирует клетки His⁻, должен бы образовывать бляшки. Однако все клетки заражены и потому не могут расти и образовывать газон. В результате если проводить высев обычным образом, то должны бы образоваться бляшки (прозрачные пятна) на прозрачной чашке. Поэтому важно, чтобы на такие чашки высевалось очень много клеток — столько, чтобы чашка слегка замутилась. Тогда можно будет ясно разглядеть прозрачные бляшки. Так как во время литического цикла происходит активная транскрипция генома фага λ, то желательно, чтобы клонированная последовательность, попавшая в центральную область генома фага, транскрибировалась и с какого-нибудь фагового промотора. В этом случае встроенные гены могут экспрессироваться во время литического цикла инфекции, даже если при них нет собственного промотора. Поэтому фаг, выявленный на основании результатов комплементации при литической инфекции, может быть и неспособным комплементировать в двойном лизогене. Поскольку бля-

шка образуется в результате нескольких последовательных циклов инфекции, то реверсии клеток, как правило, не приведут к образованию бляшек некомплементирующим фагом.

Методика

1. Отдельной колонией *E. coli* RD100 (*his B*463) засейте 40 мл минимальной среды с гистидином и мальтозой (без глюкозы). После того как культура вырастет почти до насыщения, отцентрифугируйте клетки и ресуспендируйте в 1/10 объема 10 мМ $MgSO_4$, чтобы получить концентрацию 10^{10} клетка/мл. Вырастите также 40 мл культуры BNN45 в бульоне TYM для обычного высева фага λ на чашки (см. методику 1).

Отбор лизогенов

2. Высейте пул гибридных фагов λ на чашки с газоном *E. coli* His⁻ и проведите отбор лизогенов. В качестве помощника интеграции используйте фаг λgt4-*lac*5. Приготовьте следующие чашки для отбора:
   10^8 гибридов фага λ и $2 \cdot 10^9$ λgt4-*lac*5 на одну минимальную чашку без гистидина.
   10^7 гибридов фага λ и $2 \cdot 10^9$ λgt4-*lac*5 на одну минимальную чашку без гистидина.
   10^6 гибридов фага λ и $2 \cdot 10^9$ λgt4-*lac*5 на одну минимальную чашку без гистидина.
   Высевайте по $5 \cdot 10^8$ клеток на чашку. Инкубируйте при 32°C, так как помощник интеграции несет температурочувствительную мутацию *c*I857. Высевайте на чашки также по отдельности гибриды фага λ, фаг λgt4-*lac*5 и клетки His⁻, чтобы выявить наличие загрязнения или ревертантов.

Литический отбор

3. Высейте на чашки с газоном *E. coli* His⁻ пул гибридных фагов λ и проведите отбор фагов, дающих литическую комплементацию. Разлейте чашки, не содержащие бромистого этидия в верхнем агаре. Высейте $2 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^4$ гибридных фагов λ и по $2 \cdot 10^9$ клеток на чашку. Используйте, конечно, чашки с минимальной средой M9 и минимальный верхний агар M9 без гистидина. Инкубируйте при 37°C.

Просмотрите результаты эксперимента по комплементации (литической и лизогенной). Проведите очистку бляшек четырех фагов, которые предположительно дают литическую комплементацию, на чашках LB (неселективная среда). Отберите уколом четыре колонии лизогенных бактерий, проявляющих комплементацию, и засейте ими по 1 мл бульона LB. Выращивайте при 32°C до тех пор, пока культуры слегка не помутнеют (до 10^7—10^8 клетка/мл). Растите культуру в те-

чение 2 ч при 42°С, чтобы индуцировать лизогенные бактерии. Рассейте получившиеся культуры штрихом до отдельных бляшек на чашках LB. Для газона добавьте на эти чашки LB по 20 мкл клеток RD100 или BNN45. В мягкий агар, используемый для чашек, на которых рассеваете проявившие лизогенную комплементацию фаги, добавьте 40 мкл раствора Xgal (40 мг/мл). Это делается для того, чтобы выявить фаг—помощник интеграции (λgt4-*lac*5).

Перепроверка комплементации

4. Проведите перепроверку клонов, которые по предварительным данным дают комплементацию, на минимальных чашках М9. Отберите уколом бляшки с чашек LB и ресуспендируйте каждую в 100 мкл среды для разведения фага λ. Выберите четыре фага (бесцветные бляшки) из полученных после отбора лизогенных бактерий и четыре фага из полученных после литического отбора. Рассейте штрихом все эти восемь фагов на одну минимальную чашку М9 с клетками His^- и с $2 \cdot 10^9$ частиц фага — помощника интеграции. Остаток используйте для получения препаратов фагов на чашках LB с агарозой. После инкубации в течение 6 ч при 37°С соберите с чашек урожай. Наливайте в чашку по 5 мл среды для разведения фага λ и оставьте на ночь при 5°С.

Соберите препараты комплементирующих фагов и храните их в закупоренных аналитических пробирках с несколькими каплями хлороформа.

Просмотрите результаты перепроверки комплементации.

Быстрое выделение ДНК фага λ из препарата фага (гибридного и комплементирующего)

5. Следуйте методике 11-II быстрого выделения ДНК фага λ. Используйте препараты, полученные на чашках с агарозой.

Определение длин рестрикционных фрагментов ДНК гибридных фагов

6. Расщепите по 5 мкл каждой ДНК рестриктазой *Eco* RI и нанесите на гель 0,7%-ной агарозы. Проведите электрофорез в течение 6 ч при 50 В. Остатки препаратов быстрых лизатов фага сохраните, чтобы получить потом на чашках большие количества фагов.

Препараты с чашек

7. Приготовьте по 20 чашек каждого из трех — шести фагов, выбранных на основе результатов электрофореза в геле (см. выше). Чашки инкубируйте в течение 6 ч, после чего налейте в них по 5 мл среды для разведения фага λ при 5°С.

Сбор препаратов фага

8. Для выделения фага λ следуйте методике 4. Используйте минимальное количество пробирок. Препарат фага с 20 чашек можно уместить в две центрифужные пробирки объемом по 45 мл.

Очистка фага в растворе CsCl

9. Ресуспендируйте осажденный фаг в суммарном объеме 1 мл (по 0,5 мл на каждую из двух пробирок). Следуйте методике 4-1А для осаждения через ступенчатый градиент.

Эксперимент 9

Гибридизация бляшек

Введение

Можно выявить специфический гибридный фаг по гомологии последовательности его ДНК с радиоактивно меченной РНК или ДНК. Использованная ниже методика позволяет осуществлять проверку очень большого количества гибридных фагов.

Обоснование и план эксперимента

В бляшке фага λ содержится много фага и фаговой ДНК. Фаг и ДНК можно прямо из бляшек перенести на нитроцеллюлозу, если наложить на чашку сухой нитроцеллюлозный фильтр. После денатурации перенесенной на фильтр ДНК она оказывается уже готовой для гибридизации. Таким способом можно проверять до 25 000 бляшек на одной чашке. Связанную с фильтрами денатурированную ДНК гибридизуют с ДНК, меченной ^{32}P с помощью ник-трансляции. После этого фильтр промывают и экспонируют с ним рентгеновскую пленку. Пятна почернения на пленке соответствуют гибридизующимся клонам.

Основная методическая трудность — это сориентировать рентгеновскую пленку относительно чашки. Для этого мы пользуемся специальным ориентирующим фагом. Этот фаг содержит фрагмент ДНК, способный гибридизоваться с определенной меченной ник-трансляцией ДНК (pBR322), а также несет ген

β-галактозидазы *E. coli*. В среду на чашке добавляется Xgal, так что бляшки ориентирующего фага оказываются голубыми. Кроме того, ориентирующий фаг гибридизуется с ДНК-зондом pBR322. На чашку ориентирующий фаг можно нанести случайным образом, добавив его при высеве гибридного фага, а можно нанести капли его на определенные участки чашки. Уколом отбирают бесцветные бляшки в том месте, где была обнаружена гибридизация, очищают их и проверяют, гибридизуются ли они с меченой ДНК.

Методика

1. Проведите ник-трансляцию примерно 0,5 мкг ДНК (методика 22).

Приготовление чашек для гибридизации in situ.

2. Каждой группе нужно приготовить по восемь чашек LB, на которые в мягком агаре LB высеяно $10^4 \div 10^3$ фаговых частиц. Инкубируйте при 37°C. Пользуйтесь чашками, разлитыми за два дня до эксперимента. На каждую чашку высевайте по 20 мкл клеток BNN45 для газона. При высеве добавьте на каждую чашку по 10—20 мкл фага λgt5-*lac*5, pBR322. Можно вместо этого платиновой проволочкой нанести капли препарата данного фага на уже готовую чашку. На чашки добавьте также Xgal (внесите в мягкий агар 40 мкл раствора Xgal 40 мг/мл в демитилсульфоксиде).

Гибридизация бляшек на фильтре

3. Возьмите две чашки, на которых оказалось около 10^4 бляшек, и две чашки примерно с 10^3 бляшек. В каждой группе отберите по две самые хорошие чашки с $1 \cdot 10^3$—$3 \cdot 10^3$ бляшек и по две чашки примерно с 10^4 бляшек. Следуйте методике 21-II.

   Непременно надпишите каждый фильтр и пометьте его ориентацию. Поместите фильтры в герметизируемый мешочек с денатурированной ник-транслированной ДНК, как указано в методике 23, и заварите его. Обязательно наденьте двойные перчатки, защитные очки и пластиковый фартук.

Экспозиция пленки с фильтром

4. Надрежьте мешочек, в котором проводили гибридизацию, по заваренному месту и слейте гибридизационную смесь. Разрежьте мешочек и выньте фильтр. Промойте фильтр, как описано в методике 23. Гибридизационную смесь поместите в холодильник и храните для повторного использования. *Обязательно наденьте двойные перчатки, защитные очки и пластиковый фартук.* Высушите фильтр. Оберните его пластико-

вой пленкой, чтобы не загрязнить кассету и усиливающий экран. Экспонируйте фильтр с рентгеновской пленкой (см. методику 24).

Проявите пленку, экспонированную с фильтром

5. Наложите исходную чашку с бляшками на пленку. Отберите уколом платиновой проволочкой до восьми бляшек с той области чашки, в которой проявилась гибридизация. Рассейте их методом штрихования сверху до отдельных бляшек, используя по 1/8 чашки для рассева каждой бляшки. Переколите таким образом до четырех обнаруживших гибридизацию областей. Инкубируйте при 37°С в течение по крайней мере 6 ч. Переколите отдельные бляшки по шаблону, инкубируйте в течение ночи при 37°С.

Гибридизация бляшек на фильтре II

6. Приготовьте новый фильтр-реплику с тех бляшек, которые были рассеяны и переколоты по шаблону. После отжига поместите этот новый фильтр-реплику в новый мешочек, добавьте в него гибридизационную смесь и заварите его. *Обязательно наденьте двойные перчатки, защитные очки и пластиковый фартук.* Начинать все это нужно в начале рабочего дня. Чашку с бляшками поместите в холодильник.

Экспонирование фильтра с пленкой

7. После гибридизации фильтра II в течение по крайней мере 6 ч выньте фильтр, промойте его, промокните насухо и оберните пластиковой пленкой. Экспонируйте с ним рентгеновскую пленку. При необходимости можно использовать кассету, которой не пользовались для полосок, отпечатанных с геля. Экспонируйте около 6 ч.

Проявление пленки, экспонированной с фильтром II, и получение препаратов фага на чашках с агарозой

8. Примерно через 6 ч проявите пленку, экспонированную с фильтром II. Выявите бляшки, соответствующие гибридизации. Отберите их уколом и приготовьте препараты фага на чашках. Используйте чашки с агарозой и следуйте методике 11-II быстрого выделения фаговой ДНК. Выращивайте по одной чашке каждого фага (от одного до шести). После выращивания в течение 6 ч налейте на чашку 5 мл среды для разведения фага λ и инкубируйте при 5°С в течение 2—12 ч. Если позволит время, то, используя быстрый метод, выделите ДНК из этих препаратов фага.

Определение длин рестрикционных фрагментов ДНК гибридных фагов λ

9. Расщепите по 5 мкл каждой ДНК рестриктазами *Eco*RI и *Hind* III и нанесите на гель 0,7%-ной агарозы. Проводите электрофорез в течение 6 ч при 50 В. Остатки тех препаратов фага, из которых быстрым методом были выделены ДНК, сохраните, чтобы вырастить фаг на чашках в большом количестве.

Препараты с чашек

10. Приготовьте по 20 чашек каждого из трех — шести фагов, выбранных на основании результатов электрофореза в геле. Выращивайте в течение 6 ч. Налейте на чашки по 5 мл среды для разведения фага λ при 5°С.

Сбор фага с чашек

11. Следуйте методике 2 выделения фага λ вплоть до стадии центрифугирования. Используйте минимальное число пробирок. Препарат с 20 чашек можно уместить в две центрифужные пробирки объемом 45 мл.

Очистка фага в растворе CsCl

12. Ресуспендируйте осажденный фаг в суммарном объеме 1 мл (по 0,5 мл на каждую из двух пробирок). Следуйте методике 4-IA очистки в ступенчатом градиенте.
13. Продолжайте очистку фага.

Обсуждение

Ник-трансляция — процедура довольно длительная, и начинать ее следует как можно раньше. *Обязательно наденьте фартук для работы с радиоактивностью, халат, защитные очки и двойные перчатки.* Пользуясь ручным счетчиком, постоянно проверяйте, нет ли загрязнения радиоактивностью (см. методику 22). Необходимо заранее запастись ^{32}P-CTP или другим меченным ^{32}P дезоксирибонуклеозидтрифосфатом, ДНКазой I, дезоксирибонуклеозидтрифосфатами, а также буфером 10×NT, останавливающим раствором и буфером TE.

Эксперимент 10

Гибридизация из геля (блот-гибридизация)

Введение

Проведя гибридизацию рестрикционных фрагментов, полученных прямо из клеток *S. typhimurium* дикого типа и различных делеционных мутантов, можно выявить, какие из них гомологичны специфической ДНК-зонду. С помощью такой гибридизации можно определить как приблизительный порядок этих делеций на карте, так и положение их концов.

Обоснование и план эксперимента

Выделяют ДНК из различных штаммов *Salmonella*. Выделяют ее прямо из колоний, используя методику быстрого выделения ДНК. Затем выделенную ДНК расщепляют разными рестрикционными эндонуклеазами, проводят электрофорез в агарозном геле и разделенные фрагменты переносят на нитроцеллюлозу. После этого проводят гибридизацию таких полосок нитроцеллюлозы с ДНК, меченной ^{32}P с помощью ник-трансляции. С этими полосками экспонируют рентгеновскую пленку. После того как пленка проявлена, можно определить размеры тех рестрикционных фрагментов, которые гомологичны использованной ДНК-зонду.

Методика

Быстрое выделение ДНК

1. Прямо из колоний штаммов, полученных в эксперименте 5, выделите ДНК. Можно выделять ДНК также и из небольших жидких культур объемом 1 мл. При выделении ДНК из колоний следуйте методике 12-II. Ресуспендируйте ДНК в 50 мкл раствора, содержащего 10 мМ трис (pH 7,5), 10^{-4} М Na_2-ЭДТА, 10 мкг/мл РНКазы.

Расщепление рестрикционной эндонуклеазой

2. Расщепите 10 мкл полученной выше ДНК рестриктазой *Eco*RI, 10 мкл рестриктазой *Hind*III и 10 мкл совместно рестриктазами *Eco*RI и *Bam*H1 или *Eco*RI и *Hind*III, или *Hind*III и *Bam*HI.

Электрофорез в геле

3. Каждую пробу расщепленной ДНК нанесите целиком в одну ячейку геля 0,7%-ной агарозы. Пользуйтесь *трис*-ацетатным

буфером. Проводите электрофорез в течение ночи (при 20 В в течение 18 ч или при 30 В в течение 12 ч).

Используя методику 21-I, перенесите ДНК из геля на нитроцеллюлозу. Перенос проводите в течение ночи.

Гибридизация с набором рестрикционных фрагментов

4. Снимите полоску нитроцеллюлозы с геля, промойте и проведите отжиг. Поместите его в герметизируемый мешочек и добавьте зонд, как описано в методике 23.

   После гибридизации в течение по крайней мере 24 ч выньте полоску нитроцеллюлозы, на которую был перенесен материал из геля, из мешочка, в котором проводилась гибридизация. Промойте ее, промокните досуха, оберните в пластиковую пленку и экспонируйте с рентгеновской пленкой.

   Проявите пленку. Напишите на ней полное время экспозиции. Если экспозиция оказалась недостаточной, то заложите новую пленку.

Эксперимент 11

Электронная микроскопия ДНК

Введение

Вопреки распространенному мнению электронная микроскопия ДНК представляет собой простую, быструю и надежную методику. При этом изучаются индивидуальные молекулы ДНК и можно увидеть все молекулы, так что этот метод очень хорошо дополняет метод электрофореза в геле. При электрофорезе в геле выявляются лишь популяции молекул с одинаковыми размерами. Помимо обычной визуализации ДНК можно, исследуя гетеродуплексы, проводить картирование негомологичных областей.

Обоснование и план эксперимента

Сначала визуализируют ДНК, используя водную методику и окрашивание уранилацетатом. Это очень быстрая методика, и ее действительно можно с успехом использовать в тех случаях, когда нужно качественно определить размеры молекул в образ-

це ДНК или их пространственную топологию. Вторая часть предлагаемого эксперимента заключается в образовании гетеродуплексов и их визуализации с использованием методики повышения концентрации формамида. В первую очередь следует провести гетеродуплексный анализ фагов. Затем можно провести и картирование делеций, полученных при выполнении этого курса.

Методика

1. Демонстрирование и опробование электронного микроскопа.
2. Демонстрирование водных препаратов ДНК для электронной микроскопии. Для этого нужен препарат ДНК. Следуйте методике 27.
3. Демонстрирование формамидных препаратов ДНК для электронной микроскопии. Для гетеродуплексного анализа необходимы препараты фага. Следуйте методике 28.
4. Сделайте фотографии гетеродуплексов с наилучших из полученных сеточек.
5. Электронно-микроскопический гетеродуплексный анализ исследуемого фага.

Эксперимент 12

Субклонирование из фага λ в плазмидном векторе

Введение

ДНК, клонированную в фаге λ, можно перенести в плазмидный вектор. Так как размер плазмидного вектора меньше размера вектора λ, то многие методики рестрикционного картирования и определения нуклеотидных последовательностей в этом случае значительно упрощаются.

Обоснование и план эксперимента

Для субклонирования используется векторная плазмида pBR322. Этот вектор является $Amp^R Tet^R$ Выделяют ДНК этой плазмиды и проводят ее очистку равновесным центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия с бромистым эти-

дием. Для субклонирования можно пользоваться несколькими ферментами, но нужно заранее решить, какую рестриктазу будете для этого использовать. Лучше всего, однако, использовать рестриктазу *Eco*RI, так как именно этот фермент и использовался для получения гибридных фагов. Субклонирование может быть облегчено использованием двух рестрикционных ферментов (когда и вектор, и субклонируемый фрагмент расщепляют двумя ферментами, например *Eco*RI и SalI).

Методика

1. Рассейте штрихом до отдельных колоний штамм RD103-HB101 (pBR322).

   Проверьте штамм RD103 на устойчивость к тетрациклину и ампициллину. Проверенную культуру сохраните.

   Посейте 100 мл ночной культуры RD103.

Выделение ДНК pBR322.

2. Следуя методике 12-I, выделите плазмидную ДНК из 100 мл культуры HB101 с плазмидой pBR332. Используйте объемы для одной пробирки от ротора 50 Ti.

   Из градиента отберите ДНК pBR322 и экстрагируйте из нее бромистый этидий. Осадите ДНК этиловым спиртом или диализуйте ее против 0,1 M NaCl, 0,05 M и трис (pH 7,5) и 0,1 мM Na_2-ЭДТА.

   Вырастите ночные культуры штамма RD102-HB101/λ.

Выделение ДНК фага λ

3. Следуя методике 11-I, выделите ДНК фага λ, используя примерно половину препарата фага.

   Перенесите фрагмент (фрагменты) ДНК из фага λ в плазмиду pBR322. Расщепите ДНК рестриктазой *Eco*RI или смесью рестриктаз. Возьмите 20—50 частей (по весу) ДНК гибридного фага λ на 1 часть ДНК плазмиды pBR322. Ковалентно соедините их, обработав ДНК-лигазой фага T4. Проведите трансфекцию клеток RD102, проводя отбор либо на устойчивость к тетрациклину, либо на устойчивость к ампициллину.

Эксперимент 13

Встраивание $F'_{ts}lac^+$, направляемое Tn*10*

Введение

Транспонируемые элементы могут выступать в качестве областей гомологии при различных генетических процессах, приводя к образованию делеций, дупликаций, транспозиций и, по-видимому, инверсий тех или иных фрагментов хромосом. Цель предлагаемого эксперимента заключается в попытке провести одну из таких операций. В данном случае транспозон Tn*10* будет использован в качестве области гомологии между эписомой F′ и хромосомой бактерии. Рекомбинация между такими элементами Tn*10* может обусловить встраивание эписомы F′ в хромосому, что приведет к образованию штамма Hfr. Если определить точку начала переноса этого Hfr и направления переноса, то можно узнать положение элемента Tn*10* в хромосоме и его ориентацию (Chumley et al., 1979).

Обоснование и план эксперимента

Каждая группа использует по две случайные неохарактеризованные вставки Tn*10* в хромосому *Salmonella* (полученные в эксперименте 1). Должно быть определено положение этих элементов Tn*10* на генетической карте и их ориентация. Идея заключается в том, чтобы встроить плазмиду F'_{ts}Tn*10lac*$^+$ в тот элемент Tn*10*, который находится в хромосоме. Полученный в результате этого штамм Hfr скрещивают затем с различными реципиентами, определяя в результате точку начала его переноса и направление переноса. Таким образом, определяется локализация и ориентация последовательностей Tn*10* в хромосоме.

Методика

1. Посейте LB-культуры штаммов со встроенными в хромосому элементами Tn*10*. Посейте также культуры (при 30°С) штаммов с эписомами F'_{ts} Tn*10lac*$^+$ (TT627, TT628 и TT629).
2. Перенесите эписомы F'_{ts} в каждый из мутантов со случайной вставкой Tn*10*. Это можно сделать, нанеся капли культур на селективную чашку (NCE+лактоза). На одно место чашки нанесите каплю культуры реципиента, на другое — каплю культуры донора, а на третье — капли и той и другой культуры. После того как жидкость впитается, штрихом рассейте материал каждого пятна по своему сектору чашки. Это делается для того, чтобы из конъюгационной смеси получить от-

дельные колонии экасконъюгантов, а не просто зоны сплошного роста на месте нанесения капель. Инкубируйте чашки в течение 36—48 ч при 30°С.

3. Из пятна конъюгации отберите уколом несколько больших колоний. (В контрольных пятнах колоний быть не должно). Это и есть реципиенты, получившие плазмиду F'_{ts} *lac*+. Каждую из этих колоний рассейте штрихом на двух минимальных чашках NCE с лактозой. Одну чашку инкубируйте при 40°С, а другую — при 30°С.
4. Через 48 ч должен вырасти штрих на чашке, инкубируемой при 30°С. На той чашке, которая инкубировалась при 40°С, на месте штриха должно быть лишь несколько больших колоний. Это и есть искомые Hfr-клетки. Они являются Lac+ при той температуре (40°С), при которой невозможна автономная репликация эписомы F'_{ts} *lac*+. Как предполагается, гены *lac*+ эписомы F′, встроившись в хромосому, перестали быть чувствительными к температуре. Уколом отберите несколько таких предположительных Hfr-клеток и вырастите их культуры в жидкой селективной среде (NCE+0,5% лактозы) при 40°С. Также посейте в LB (при 37°С) культуры ряда реципиентов, которые будут использоваться для картирования. Это единичные ауксотрофы, каждый из которых несет также мутацию устойчивости к стрептомицину. Нужно немного таких штаммов. Поэтому можно рискнуть и приготовить один набор реципиентных культур сразу на несколько групп. Чтобы сэкономить чашки, можно и контрольные чашки с реципиентами приготовить сразу на несколько групп.
5. Для картирования точек начал переноса Hfr-штаммов проведите скрещивания на чашках. В первых скрещиваниях штаммы донора и реципиента (по 0,1 мл каждого) высевайте прямо на селективную среду (Е+стрептомицин). Инкубируйте чашки при 37°С.
6. Подсчитайте число рекомбинатов. Учитывайте положение на карте маркеров реципиентов. Таким способом можно определить направление переноса, но лишь приблизительное положение на карте точки начала переноса Hfr. Для более точного картирования возьмите самые близкие к точке начала переноса маркеры и используйте разведения донорной культуры. Для дальнейшего уточнения данных по картированию необходимо уже определять время вхождения маркера или проводить трехфакторные скрещивания.

Обсуждение

1. Эти эписомы F'_{ts} несут мутацию, которая препятствует их репликации при 40°С. Они содержат также *lac*+-оперон дикого типа и вставку Tn*10* в известной ориентации. Эписомы в

штаммах TT627 и TT629 содержат Tn*10* в одной ориентации (ориентации A). В эписоме штамма TT628 Tn*10* встроен в противоположной ориентации (ориентации B) по отношению к направлению переноса.

2. Обычно клетки *Salmonella* являются Lac^-, но могут стать Lac^+, если получат эписому $F'lac^+$ от *E. coli*. Эти чашки следует инкубировать при 30°C, чтобы могли происходить перенос и репликация мутантной эписомы F′.
3. В штрихах из пятен скрещивания могут появиться также и крошечные колонии. Это колонии реципиента Lac^-, выросшие на попавших с каплей пищевых добавках или из-за перекрестного питания, обеспечиваемого большими колониями Lac^+. Поэтому в данном эксперименте отбирайте уколом лишь большие колонии.
4. Чтобы избежать вырезания $F'lac^+$, штаммы Hfr выращивают в селективных условиях. Важно быстро выделить и использовать эти штаммы Hfr. Если перед тем, как их использовать, с этими штаммами длительно работали (т. е. проводили повторную их очистку или хранили их), то в них могли произойти перестройки, затрудняющие интерпретацию полученных результатов. Если же штаммы Hfr использовали сразу же после их выделения, то ориентация вставок Tn*10* может быть определена однозначно.

Литература

Chumley F. G., Menzel R., Roth J. R., 1979. Hfr formation directed by Tn*10*, Genetics, **91**, 639.

Раздел II

МЕТОДИКИ

Методика 1

Очистка фага методом бляшек

I. Клетки-хозяева

1. Вырастите ночную культуру любого бактериального штамма, чувствительного к фагу λ (например, штамма BNN45) в среде LB или TYM.
2. Если клетки будут использоваться для высева фага λ, то осадите их центрифугированием (5 мин при 8000 об/мин), ресуспендируйте в $^1/_2$ объема 0,01 М $MgSO_4$ и храните при 4°C. Если клетки будут использоваться для высева фага P22, то разведите культуру и подрастите до экспоненциальной фазы. После этого клетки охладите и храните при 4°C в ростовой среде.

II.А. Штрихование нижнего агара

1. Петлей или тонкой проволочкой нанесите фаг штрихом на чашку с агаром LB или на чашку для фага λ.
2. К 2,5 мл мягкого агара при 47°C добавьте 20—100 мкл культуры для высева.
3. Вылейте смесь на чашку, но не прямо на то место, где начинается штрих фага.
4. Когда агар застынет, переверните чашку и инкубируйте ее при подходящей температуре. Учтите, что фаг λ не развивается при температурах ниже 30°C.

II.Б. Штрихование сверху

1. К 2,5 мл мягкого агара при 47°C добавьте 20—100 мкл газонной культуры.
2. Вылейте смесь на чашку с агаром В или с агаром для фага λ и подождите, пока агар полностью застынет.
3. Очень тонкой платиновой проволочкой или полоской стерильной газетной бумаги [(2,5—1,25)×0,31 см] осторожно рассейте фаг штрихом по поверхности агара.
4. Инкубируйте при 30—42°C.

III. Отбор бляшки уколом

1. Проткните бляшку стерильным стеклянным капилляром или микропипеткой (на 10—50 мкл).

2. Суспендируйте в небольшом количестве (20 мкл — 1 мл) среды для разведения фага λ или суспензии газонной культуры — в зависимости от того, что удобнее. Если препарат будете хранить, то суспендируйте в 1 мл среды для разведения фага λ и добавьте 1 каплю хлороформа, чтобы убить бактерии.

IV. Титрование фага

1. Приготовьте последовательные разведения фага в среде для разведения фага λ (10 мМ трис, рН 7,5 и 10 мМ $MgSO_4$).
2. Смешайте 1—200 мкл разведенного фага, предположительно около 100 частиц, с 20—100 мкл газонной культуры.
3. Инкубируйте в течение 15 мин при 37 или 25°С, чтобы фаг адсорбировался на клетках. В случае фага Р22 этого можно не делать.
4. Смешайте с 2,5 мл мягкого агара при 47°С.
5. Вылейте смесь на чашку с агаром для фага λ или на чашку LB.
6. Инкубируйте при 32—42°С.

Обсуждение

I. Для газона можно использовать клетки любого штамма, на котором образуются четко выраженные бляшки. Многие штаммы *E. coli* устойчивы к заражению фагом λ (они обозначаются как /λ). Большинство амбер-мутаций фага λ может супрессироваться супрессором *supE* (*su*2+), который присутствует в штамме С600. Имеющаяся во многих штаммах фага λ мутация λ*S*am7 супрессируется супрессором *supF*(*su*3+), который есть в штамме BNN45 в дополнение к супрессору *supE*. Белок бактерии, на котором адсорбируется фаг λ, кодируется геном, входящим в состав индуцируемого мальтозой *mal*-оперона. Поэтому клетки, выращенные на мальтозе (в среде TYM), очень хорошо адсорбируют фаг λ. Однако при высеве фага чашки не должны содержать мальтозы, так как вторичная адсорбция на чашке приводит к снижению конечного выхода фага. Стационарную культуру можно хранить в растворе $MgSO_4$. Если же высев проводят сразу после ее получения, то можно использовать непосредственно выращенную культуру. Культуру можно хранить в $MgSO_4$ при 5°С до двух недель. Однако эффективность высева оказывается наибольшей, а морфология бляшек оказывается более однородной, если пользоваться клетками, полученными не более чем за 1 сутки до опыта. Высев фага Р22 оказывается наилучшим при использовании экспоненциальных культур *Salmonella*, хранившихся на холоду не более 36 ч.

II. А. Фаг рассеивают штрихом точно так же, как культуры бактерий. Используйте для этого либо чашку для фага λ, либо чашку LB. На чашках для фага λ бляшки получаются большего размера. Размер бляшек увеличивается также, если использовать для газона меньше клеток. Поскольку предадсорбция фага не проводится, то акты инфицирования, приводящие к образованию бляшек, могут быть сильно растянуты во времени. Поэтому размер бляшек может варьировать. В данном случае вариабельность размера бляшек не обязательно указывает на гетерогенность генотипа фага. Этот метод очень удобен для тех, у кого мало опыта, однако он имеет тот недостаток, что на каждой чашке можно провести очистку лишь одного фага.

Б. Эта методика сложнее, чем методика А, но она обладает тем преимуществом, что на одной чашке можно рассеять штрихом одновременно несколько фагов. Рассев штрихом проводить легче, если сделать верхний агар более твердым. Для этого чашки следует охладить.

III. Обычно бляшки становятся видимыми примерно через 6 ч. Как только клетки достигают стационарной фазы, бляшки перестают увеличиваться. Фаг, однако, продолжает диффундировать в слое верхнего агара со скоростью около 1 см/сутки. Поэтому следует отбирать уколом наиболее изолированные бляшки сразу после того, как они становятся хорошо различимыми, чтобы исключить возможность загрязнения частицами из соседних бляшек. Рекомендуется проводить повторную очистку бляшек, так как нельзя быть уверенным, что бляшка совсем не загрязнена какими-либо примесями.

IV. Обычно, чтобы получить разведение 1 : 100, вносят 0,1 мл в 9,9 мл среды для разведения фага λ, или 10 мкл в 0,99 мл такой среды. Можно развести фаг и в 1000 раз. Для этого вносят 1 мкл препарата в 1 мл среды для разведения фага λ. При хранении препарата фага в течение нескольких месяцев титр в нем может упасть более чем в 10 раз. Поэтому при испытании старых препаратов желательно высевать также и несколько меньших разведений фага. Удобно помечать чашки, надписывая на них общие данные о высеянном разведении. Зарегистрируйте, например, просто показатель степени разведения и высеянный объем. Так, если высеяли 0,05 мл разведения 10^{-7}, то напишите на чашке 7/0,05.

Методика 2

Получение препаратов фага

I. Клетки-хозяева (см. методику 1)

II. Засев чашек

1. Смешайте 10^6 частиц фага с 20—100 мкл культуры клеток-хозяев.
2. Инкубируйте 15 мин при 37 или 25°С. В случае фага Р22 этого можно не делать.
3. Смешайте смесь с 2,5 мл мягкого агара LB (при 47°С) и вылейте на влажную (свеже разлитую) чашку LB.
4. Инкубируйте не переворачивая в закрытом (влажном) ящике при 37°С.

III. Сбор фага

1. После того как наступит сплошной лизис (примерно через 6 ч), охладите чашки, перенеся их в холодную комнату.
2. Налейте по 5 мл холодной среды для разведения фага λ (10 мМ трис, рН 7,5 и 10 мМ $MgSO_4$) на чашку. Оставьте чашки на ночь в холодной комнате.
3. Соберите налитую на чашки жидкость, добавьте в нее 2 капли $CHCl_3$ (с этанолом). На этой стадии неочищенный препарат фага может храниться при 5°С в течение нескольких лет. Можно заложить его и на длительное хранение (см. приложение 3). Если полученный препарат фага λ будет использован для выделения ДНК, то нужно тщательно избегать загрязнения суспензии фага кусочками агара и перейти к следующему этапу.
4. Чтобы удалить обломки клеток, проведите низкоскоростное центрифугирование (около 10 000 об/мин в течение 10 мин) в роторе Sorvall, SS-34 или Beckman JA-20.
5. Чтобы осадить фаг, центрифугируйте в течение 3 ч при 20 000 об/мин.
6. Ресуспендируйте фаг в 1 мл среды для разведения фага λ (см. обсуждение). Перенесите суспензию в пробирку на 1,5 мл от микрофуги Eppendorf и центрифугируйте в течение 5 с, чтобы удалить остатки обломков клеток. Полученные на этой стадии препараты можно использовать для выделения ДНК, а можно и хранить.
7. Для дальнейшей очистки фага (и чтобы получить более устойчивые препараты) следуйте методике 4-IA.

С одной чашки получается примерно 4 мл суспензии фага с концентрацией $2 \cdot 10^{10}$ частица/мл или около 10 мкг очищенной ДНК.

Обсуждение

I. См. методику 1.

II. 1. Количество фага и клеток, высеваемых на чашку, зависит от размера бляшек. Наиболее высокие титры препаратов получаются тогда, когда бляшки на чашке соприкасаются, давая сплошной лизис. Если бляшки сильно перекрываются, то клетки газона убиваются слишком рано, чашки получаются очень прозрачными, а выход фага — низким. Если бляшки не перекрываются, то заражено слишком мало клеток, что приводит к низкому выходу фага. Однако точное соотношение фага и клеток не имеет критического значения.

2. Инкубация фага и клеток в высоких концентрациях гарантирует хорошую адсорбцию.

3. Агар не следует охлаждать ниже 47°C, так как в противном случае он начнет затвердевать. Если же он окажется намного горячее, то погибнет много клеток. Если агар был расплавлен не полностью, то чашка после инкубации будет рябой и бляшки будут плохо различимы. Следует наливать в чашки тонкий слой нижнего агара. Он должен быть влажным, чтобы растущие бляшки соприкоснулись и получился сплошной лизис.

4. При инкубации чашек крышками вверх конденсат капает на газон, что помогает получению сплошного лизиса. Обычно мы инкубируем чашки в большом закрытом пластмассовом ящике, на дно которого уложены влажные бумажные полотенца.

III. 1. (Этапы 1 и 2); если урожай фага снимать с чашек до наступления сплошного лизиса или спустя несколько часов по его достижении, то получаются препараты с пониженным титром. Момент наступления сплошного лизиса зависит от размера бляшек, количества высеянных на чашку фага и клеток, а также от скорости роста клеток. В случае фага дикого типа при описанных выше условиях сплошной лизис наступает примерно через 6 ч. Если фаг образует мелкие бляшки, то это время может возрасти до 8 ч. Когда чашки охлаждают, верхний агар становится более твердым и уже не смещается при наслаивании жидкости. За ночь фаг из верхнего агара диффундирует в налитую на чашку жидкость.

2. (Этапы 3, 4 и 5); добавляют хлороформ, поскольку он убивает все клетки и предотвращает бактериальный рост при длительном хранении. Чтобы в хлороформе не накапливались продукты окисления, в него добавляют этиловый спирт [несколько капель на пинту (~0,5 дм³) хлороформа]. На этой стадии полученный с чашек препарат фага можно хранить. Если такие препараты поместить в герметически закрытые пробирки, их можно хранить в течение примерно 5 лет. Если из очищенного фага будете выделять ДНК, то работайте аккуратно и не захватите кусочков агара, который является мощным ингибитором многих ферментов, работающих на ДНК. Его не так просто удалить и при очистке в градиенте плотности CsCl, так как часть агара обладает той же плотностью, что и фаг, и характеризуется высоким коэффициентом седиментации. Если же выделяемый препарат фага будет все же загрязнен агаром, то часть этого агара можно удалить, проведя центрифугирование перед очисткой фага в градиенте плотности CsCl. Не центрифугируйте фаг дольше, чем это необходимо для осветления. При излишнем сжатии осадка частицы фага могут повредиться, что приведет к потерям ДНК.
3. (Этап 6); если фаг не подвергался излишнему сжатию, то его очень легко суспендировать. Тем не менее лучше оставить осадок фага набухать в жидкости в течение нескольких часов на холоду перед тем, как суспендировать его, применяя физическое воздействие. При втором, очень кратковременном центрифугировании удаляются остатки обломков клеток и агара, а фаг не теряется. Если из препарата будете выделять ДНК, а он загрязнен агаром, то проведение этапа 6 обязательно.

Методика 3

Быстрый метод получения трансдуцирующего фага P22

1. Засейте 1 мл бульона LB тем штаммом, который хотите использовать в качестве донора. Вырастите культуру до насыщения. После инкубации в течение ночи при 37°C культура должна содержать $2 \cdot 10^9$ клетка/мл.

2. Заразите фагом Р22 (НТ, *int*⁻) с множественностью 0,01—0,1 фаговых частиц на клетку. Обычно к 1 мл ночной культуры добавляют 4 мл бульона Р22. Бульон Р22 — это бульон LB с полным количеством солей Е (1х), содержащий 0,2% глюкозы и $5 \cdot 10^6$ БОЕ/мл фага Р22 (НТ, *int*⁻). В такой среде фаг довольно стабилен при комнатной температуре. Используемый мутант фага Р22 осуществляет неспецифическую трансдукцию с повышенной частотой (НТ; Schmieger, 1972) и не образует устойчивых лизогенов (*int*⁻).
3. Инкубируйте в течение 5—18 ч при 37°С при встряхивании. Культура может не просветлеть.
4. Низкоскоростным центрифугированием удалите клетки и их обломки.
5. Надосадочную жидкость перенесите в пробирку с 0,5 мл хлороформа, перемешайте в смесителе.
6. Оттитруйте лизат (см. методику 1). Он должен содержать 10^{10}—10^{11} частиц фага в 1 мл.

Обсуждение

Следует заметить, что при суспендировании отдельной бляшки фага Р22 в 4 мл бульона LB получается суспензия с концентрацией около 10^6 частиц фага в 1 мл. Поэтому такую суспензию можно использовать как источник фага для получения препарата из отдельной бляшки любого фага Р22 описанным выше методом.

Литература

Schmieger H., 1972. Phage P22 mutants with increased or decreased transduction abilities, Mol. Gen. Genet., **119**, 75.

Методика 4

Очистка фага

Эти методики можно использовать последовательно, а можно прямо приступать к равновесному центрифугированию.

I. Ступенчатые градиенты CsCl для ротора Beckman 50.1

А. Для очистки от белков фаг лучше всего осадить в растворе CsCl из верхней части пробирки.

1. На дно нитроцеллюлозной пробирки размером $^1/_2\times2$ дюйма[1] от центрифуги Beckman налейте 1 мл раствора 5,0 М CsCl, 10 мМ $MgSO_4$, 10 мМ трис (pH 8) и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА ($\rho=1,6$).
2. Наслоите 3 мл раствора 3,0 М CsCl, 10 мМ $MgSO_4$, 10 мМ трис (pH 8) и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА ($\rho=1,4$).
3. Наслоите 1 мл суспензии фага в буфере для разведения фага λ (10 мМ $MgSO_4$ и 10 мМ трис, pH 7,5). Если фаг уже находится в растворе CsCl ($\rho=1,5$), то сначала разведите 0,5 мл такой суспензии фага 0,5 мл буфера для разведения фага λ.
4. Центрифугируйте в роторе SW50.1 при 30 000 об/мин в течение 1 ч при 20°C.
5. Шприцом на 1 мл с иглой 5/8 дюйма номер 25 проколите пробирку сбоку и отберите фаг. Отбирайте не более 0,5 мл.

Б. Для очистки от ДНК и РНК лучше всего сделать так, чтобы фаг всплыл со дна пробирки в растворе CsCl.

1. На дно нитроцеллюлозной центрифужной пробирки налейте 0,5 мл фага, суспендированного в растворе CsCl с плотностью, соответствующей плавучей плотности фага (т. е. с $\rho\cong1,5$).
2. Добавьте равный объем (0,5 мл) насыщенного (при 25°C) раствора CsCl (7,2 М) в 10 мМ $MgSO_4$, 10 мМ трис (pH 8) и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА ($\rho=1,92$). Хорошо перемешайте.
3. Наслоите 3 мл раствора 5,0 М CsCl в 10 мМ $MgSO_4$, 10 мМ трис (pH 8) и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА ($\rho=1,6$).
4. Наслоите 1 мл раствора 3,0 М CsCl в 10 мМ $MgSO_4$, 10 мМ трис (pH 8) и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА ($\rho=1,4$).
5. Центрифугируйте в роторе SW50.1 при 30 000 об/мин в течение 1 ч при 20°C.
6. Шприцом на 1 мл с иглой 5/8 дюйма номер 25 проколите пробирку сбоку и отберите фаг. Отбирайте не более 0,5 мл.

II. Равновесный градиент для ротора SW 50.1

1. Перенесите фаг, суспендированный в 4,0 М CsCl, 10 мМ $MgSO_4$, 10 мМ трис(pH 8) и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА (раствор CsCl с плотностью равной плавучей плотности фага) в нитроцеллюлозную пробирку размером $^1/_2\times2$ дюйма от центрифуги Beckman.
2. Центрифугируйте в роторе SW 50.1 при 30 000 об/мин при 20°C в течение по крайней мере 16 ч.

---

[1] 1 дюйм равен примерно 2,5 см. — Прим. ред.

3. Шприцом на 1 мл с иглой 5/8 дюйма номер 25 проколите пробирку сбоку и отберите фаг.
4. Отбирайте не более 0,5 мл.

Обсуждение

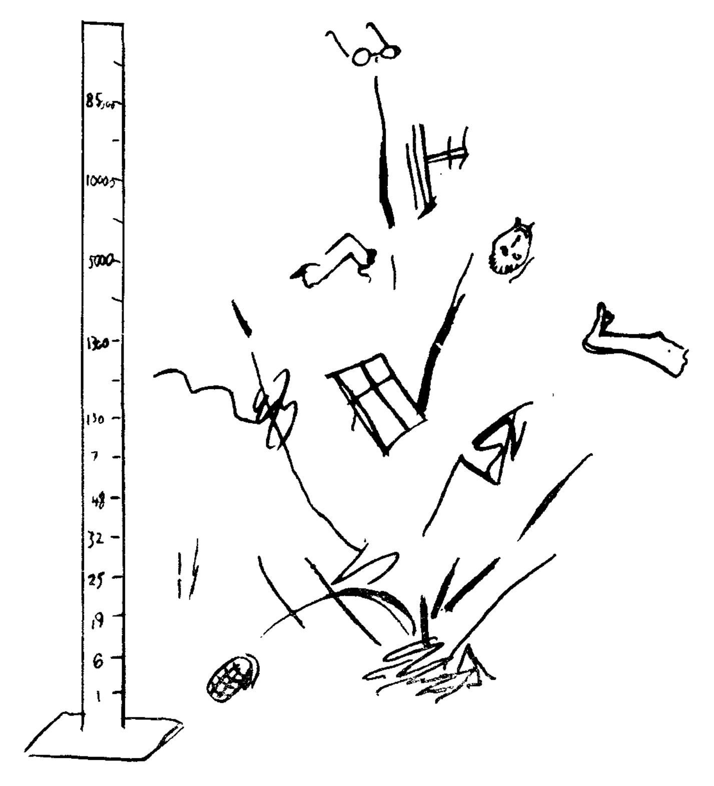
1. А. Как фаг λ, так и фаг Р22 имеют плотность около 1,5 г/мл. Точная плотность фага λ зависит от того, сколько в нем содержится ДНК. С увеличением количества ДНК в частице плотность фага возрастает. Ступенчатый градиент состоит из двух слоев раствора CsCl с плотностями 1,6 и 1,4 г/мл. Осаждающийся при центрифугировании фаг задерживается на границе между этими растворами. После того как растворы наслоены, следует отметить границу между ними, нанеся черту снаружи пробирки. Это поможет определить положение полосы фага после центрифугирования. Плотность белковых примесей составляет около 1,3 г/мл, и в растворе CsCl с плотностью 1,4 г/мл они должны всплывать. Плотность ДНК и РНК, однако, больше плотности фага, и поэтому они могут оказаться размазанными по всеми градиенту.

   Б. Это обращенный ступенчатый градиент, в котором фаг всплывает к границе между слоями с разными плотностями. При смешивании суспензии фага в растворе CsCl с плотностью, равной плавучей плотности фага ($\rho=1,5$), с равным объемом насыщенного раствора CsCl получается раствор с плотностью 1,7 г/мл. Примеси ДНК ($\rho=1,7$) и РНК ($\rho=1,9$) должны отделяться от всплывающего фага.

II. При использовании этого метода достигается хорошая очистка, но требуется более продолжительное центрифугирование. Примеси РНК, ДНК и некоторых белков за 16 ч равновесия не достигают и оказываются распределенными по всему градиенту. Данный метод обладает тем преимуществом, что градиент, в котором фаг концентрируется при равновесной плотности, оказывается гораздо более пологим, чем описанный выше ступенчатый градиент. Поэтому если препарат фага гетерогенен и содержит частицы с ДНК разной длины, то после центрифугирования можно обнаружить не одну, а несколько полос фага.

Слабую полосу фага лучше всего наблюдать, направив на пробирку сверху коллимированный пучок света от осветителя для микроскопа. Поломы лучше выявляются, если за пробиркой поместить черный экран.

BURST SIZE



Оп! В лаборатории может взрываться (burst) и лопаться многое, в том числе и эксперименты. Однако «burst size»[1] — это просто число фаговых частиц, получающихся в отдельной клетке бактерии-хозяина.

Методика 5

Транспозиция элемента Tn*10*

I. Получение дефектного трансдуцирующего фага из штамма NK 337

Дефектный трансдуцирующий фаг с транспозоном Tn*10* получают при индукции штамма NK337. Этот сложный лизоген (см.

[1] Непереводимая игра слов: burst — взрываться, а burst size — выход фага.

обсуждение) крайне нестабилен, и его следует хранить при —70°C или в лиофилизированном виде.

1. Рассейте штамм NK337 до отдельных колоний, проверьте его температурочувствительность. (Чувствительность к температуре свидетельствует о наличии профага с мутацией *c*2ts.) Чувствительность к температуре проверяют, сравнивая эффективность образования колоний при 30 и при 42°C.
2. Вырастите ночную культуру штамма NK337 объемом 30 мл при комнатной температуре (ниже 30°C).
3. Разведите культуру, перенеся все 30 мл в 1500 мл супербульона (см. приложение 1). Культуру в супербульоне вырастите до плотности $\sim 3 \cdot 10^8$ клетка/мл ($OD_{650}=0,5$; в качестве контроля обязательно используйте супербульон) при температуре 30°C или ниже.
4. Перенесите культуру в качалку в водяной бане на 39°C.
5. Инкубируйте со встряхиванием в течение 3 ч, или пока культура не лизирует.
6. Добавьте хлороформ (20 мл), перетрясите, подождите и опять перетрясите. (Клетки в супербульоне, по-видимому, плохо лизируют под действием хлороформа. Повторение в течение 15 мин циклов встряхивания и нескольких минут покоя приводит, как кажется, к хорошему результату).
7. Проведите низкоскоростное центрифугирование, чтобы удалить обломки клеток (иногда оказывается необходимым провести несколько повторных центрифугирований). Соберите надосадочную жидкость. Большинство препаратов лизирует хорошо и становится прозрачными уже после первого центрифугирования.
8. Добавьте отростки фага (методику см. ниже).
9. Сконцентрируйте частицы фага, проведя высокоскоростное центрифугирование (см. методику 2).
10. Титр фага можно определить, проведя трансдукцию штамма TR4368 (*his*-644 [P22 *sie* A27]) к Tet^R. Такая трансдукция дает оценку числа функциональных частиц с элементом Tn*10*. Этот элемент можно перенести с помощью трансдукции в профаг реципиента потому, что с обеих сторон от Tn*10* имеются гомологичные профагу последовательности фаговой ДНК. Титр частиц примерно в 10^3 раз превышает число трансдуктантов Tet^R, которые обнаруживаются в таком опыте.
11. После добавления отростков фага (см. ниже) из 1,5 л культуры получается $\sim 5 \cdot 10^{12}$ фаговых частиц.

II. Добавление отростков к головкам фага P22

Многие частицы фага, полученные после индукции клеток, лизогенных по фагу P22, оказываются без отростков. Отростки можно присоединить к таким частицам, пользуясь при-

веденной ниже методикой, в основе которой лежит метод Израиля и др. (Israel et al., 1967).

Эта методика включает получение лизата мутанта фага, дефектного по головке. Фаг этот несет также мутацию *13*⁻, которая предотвращает лизис и способствует накоплению больших количеств отростков. Для получения хвостовых отростков фага P22 используется штамм P22-503 (*c 1-7 12*amN114 *13*amH101), а в качестве его хозяев — штаммы *Salmonella* TR248 (*cysA*1349 am *hisC*527am) и TR251 (*cisA*1349am *hisC*527am *supD* [sul+]).

А. *Получение хвостовых отростков*

1. Вырастите препарат фага P22-503 на клетке-хозяине TR251 (методики 2 и 3).
2. Проверьте концентрацию ревертантов, высевая полученный препарат фага на штамм TR251 (пермиссивный для амбер-мутантов) и на штамм TR248 (непермиссивный для амбер-мутантов).
3. Вырастите 2 л культуры TR248 в бульоне LB при 37°C до плотности $\sim 2 \cdot 10^8$ клетка/мл.
4. Заразите фагом P22-503 с множественностью заражения 5 фагов на клетку.
5. После заражения инкубируйте в течение 90 мин при 37°C со встряхиванием.
6. Осадите зараженные клетки цетрифугированием (6000 об/мин, 10 мин) и ресуспендируйте их в физиологическом растворе ($^1/_{100}$ исходного объема).
7. Лизируйте клетки, добавив хлороформ и интенсивно встряхивая.
8. Обработайте ДНКазой (10 мкг/мл) в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Отцентрифугируйте препарат в течение 15 мин при 5000 об/мин, чтобы удалить обломки клеток.
10. Чтобы удалить все целые фаговые частицы, центрифугируйте в течение 2 ч при 17 000 об/мин. Проведите повторное центрифугирование. Каждый раз собирайте надосадочную жидкость и отбрасывайте осадок.
11. Проверьте надосадочную жидкость на содержание в ней интактного фага, высеяв ее на газон TR251. Фага должно содержаться менее чем 10^4 БОЕ/мл.

Б. *Присоединение хвостовых отростков к головкам*

Смешайте суспензии отростков и головок фага и инкубируйте в течение 2 ч при 30°C. Проводя высев, следите за нарастанием титра фага. Чтобы насытить $\sim 5 \cdot 10^{12}$ головок, полученных при индукции культуры NK337 объемом 1,5 л, ис-

пользуйте препарат отростков фага, полученный из культуры объемом 2 *л*.

III. Транспозиция при трансдукции

1. Вырастите реципиентные клетки в бульоне LB до плотности $5 \cdot 10^8$ клетка/мл.
2. С помощью центрифугирования (5000 об/мин, 10 мин) сконцентрируйте клетки в 10 раз (ресуспендируйте осадок в $^1/_{10}$ исходного объема).
3. Заразите фагом с множественностью заражения 0,8 частицы на клетку. Проведите адсорбцию в бульоне LB в течение 30 мин при 37°С.
4. Высейте зараженные клетки на чашки Green+тетрациклин (25 мкг/мл)+ЭГТА (10 м*М*). Чашки инкубируйте при 41°С. Переколите колонии и выявите среди них мутантов.
5. Колонии Tet^R должны появляться с частотой 1 на 10^5—10^6 зараженных клеток. Если используется описанная выше методика и если считать, что добавляется очень небольшой объем фага, то 0,1 мл зараженных клеток приводит к образованию 200 колоний Tet^R. Около 1% клонов Tet^R оказываются ауксотрофами.

Обсуждение

I. Эта методика получения дефектного трансдуцирующего фага описана Клекнером и др. (Kleckner et al., 1975). Фаг получают при индукции лизогенного штамма NK337 под действием высокой температуры. Генотип штамма NK337: *hisC*527 *leu*-414 *supE* (P22 *c2*ts29 *12*amN11 *13*amH101 *int*-3Tn*10*).

Имеющийся в этом штамме супрессор супрессирует амбер-мутации в генах *12* и *13* фага. Индукция при 40°С происходит из-за мутации *c2*ts29. Мутация в гене *int* фага обусловливает высокую частоту неправильного вырезания профага, и в результате фаги получаются дефектными, но включают элемент Tn*10*.

II. Методика транспозиции при трансдукции основана на том, что клетки заражают фагом с Tn*10* таким образом, что интеграция транспозона в результате лизогенизации или в результате обычной рекомбинации оказывается невозможной. Фаг, несущий Tn*10*, является *c2*ts, и поэтому при высокой температуре не может установиться состояние репрессии. Этот фаг также мутантен по генам *12* и *13*, так что в реципиентных su^--клетках происходит лишь очень незначительная репликация такого полного фага. Наконец, мутация int^- приводит к тому, что большинство фагов в препа-

рате оказывается дефектными из-за неправильного вырезания (см. выше разделы о выращивании дефектного фага P22 и соединении его с отростками).

Мутация *int*⁻ у реципиента препятствует также интеграции генома любого фага, избежавшего действия указанных выше рестрикций. Предотвращается также и гомологичная рекомбинация, так как транспозон Tn*10* встроен в геном фага, а используемый реципиент не содержит фаговых последовательностей.

Трансдукционные чашки содержат ЭГТА, который хелатирует ионы Ca^{2+} и тем самым препятствует адсорбции фага. В результате предотвращается размножение на трансдукционной чашке жизнеспособного фага. Использовать чашки Green не обязательно, но они недороги и позволяют выявлять те колонии, в которых размножается фаг (такие колонии оказываются темно-зелеными). Незаряженные колонии и колонии стабильных лизогенов оказываются бледноокрашенными.

Литература

Israel J. V., Anderson T. F., Levine M., 1967. In vitro morphogenesis of phage P22 from heads and base-parts, Proc. Natl. Acad. Sci., 57, 284.
Kleckner N., Chen R., Tye B.-K., Botstein D., 1975. Mutagenesis by insertion of a drug-resistance element carrying an inverted repetition, J. Mol. Biol., 97, 561.

Методика 6

Отбор мутантов Tet^s среди штаммов, несущих элемент Tn*10*

1. Вырастите в бульоне LB ночную культуру штамма, несущего транспозон Tn*10*.
2. Разведите культуру и высейте ее с селективной средой Бохнера ~10^6 клеток.
3. Инкубируйте чашки при 37°C.
4. Отберите колонии уколом и рассейте их до отдельных колоний.
5. Проверьте на устойчивость к тетрациклину.

Обсуждение

При работе со штаммами, несущими элемент Tn*10*, часто бывает полезно уметь отбирать мутантов, утративших устойчивость к тетрациклину. Такая утрата транспозона дает возможность повторно использовать Tn*10* при конструировании штаммов и, кроме того, позволяет проводить отбор делеций и инверсий, индуцированных Tn*10*. Описанная здесь методика такого отбора разработана Бохнером и др. (Bochner et al., 1980). Детальные основы такого отбора не вполне ясны, но известно следующее:

1. При автоклавировании хлортетрациклин превращается в соединение, индуцирующее функцию устойчивости, присущую Tn*10*. Это индуцирующее соединение не токсично для клеток.
2. Рост клеток, у которых индуцирована устойчивость к тетрациклину, подавляется фузаровой и хинальдиновой кислотами. Те клетки, которые в результате мутации утратили детерминанты устойчивости к тетрациклину, становятся устойчивыми к фузаровой или хинальдиновой кислоте.
3. Фузаровая и хинальдиновая кислоты представляют собой липидорастворимые вещества, способные хелатировать двухвалентные катионы.
4. Если в среду добавлено железо или марганец, то хинальдиновая и фузаровая кислоты уже не оказывают ингибирующего действия.
5. Важно, чтобы высевались небольшие количества клеток ($<10^6$ на чашку).

Литература

Bochner B., Huang H.-C., Schieven G., Ames B. N., 1980. Positive selections for loss of tetracycline resistance, J. Bacteriol., **143**, 926.

Методика 7

Выявление фага λ с функционирующим геном β-лактамазы на чашках Red

Эта методика позволяет визуально выявлять фаги с функционирующим геном β-лактамазы. Ее можно использовать для идентификации таких производных фага *λamp*, у которых мута-

ция приводит к дефекту по β-лактамазе. Суть этой методики обсуждается ниже.

1. Накануне эксперимента разлейте чашки Red (приложение 1).
2. Вырастите культуры DB6430 и DB4383 в бульоне TYM при 37°C до плотности $3 \cdot 10^8$ клетка/мл. Перед использованием не храните их очень долго (даже во льду).
3. Разведите фаг так, чтобы при высеве на чашку 0,1 мл разведения образовалось 40—100 бляшек. Добавьте 0,1 мл такого разведения фага к 0,1 мл культуры DB4383 и инкубируйте смесь в течение 20 мин при комнатной температуре.
4. К этой смеси добавьте 0,1 мл культуры DB6430, смешайте с 2,5 мл верхнего агара для фага λ и вылейте на чашку Red. Инкубируйте при 34°C.
5. Через 25 ч после высева поглядите на чашки и затем проделывайте это каждые несколько часов.
6. Важно проверить эту методику, высеяв контрольные фаги (просто λ*amp*, λ без *amp* и смесь этих фагов).

Обсуждение

В этой методике используется тот факт, что, когда β-лактамаза выделяется в среду, она разрушает ампициллин и спасает оказавшиеся рядом чувствительные *gal*$^+$-клетки. Такие спасенные *gal*$^+$-клетки сбраживают галактозу, восстанавливают тетразолий и образуют вокруг бляшки красный ореол. Для обеспечения роста фага на чашки высевают также и *gal*$^-$-клетки. Эти *gal*$^-$-клетки устойчивы к ампициллину (но не выделяют β-лактамазы). *gal*$^-$-Бактерии могут выступать в роли клеток-хозяев для фага, но не восстанавливают тетразолий (не дают красной окраски). Таким образом, клетки *gal*$^-$Amp^R (DB4383) могут расти по всей чашке, но не дают окраски. Клетки же *gal*$^+$Amp^S (DB6430) растут (и дают окраску) лишь вблизи бляшки фага λ, продуцирующего β-лактамазу (*bla*$^+$).

Важно подобрать концентрацию ампициллина на таких чашках для каждой используемой партии этого препарата. Это должна быть та минимальная концентрация ампициллина, при которой подавляется рост клеток DB6430 в газоне.

Методика 8

Индукция мутаций гидроксиламином

I. Выделение мутаций в фаге или клонированном гене (например, в гене β-лактамазы)

1. Смешайте 0,4 мл буфера фосфат-ЭДТА (0,5 М KPO_4, pH 6,0, и 5 мМ ЭДТА), 0,5 мл стерильной воды, 0,8 мл раствора гидроксиламина (свежеприготовленный 1 М NH_2OH при pH 6; 0,56мл/4М NaOH добавлено к 0,35 г NH_2OH и доведено стерильной водой до 5 мл), 0,1 мл стерильного 0,2 М $MgSO_4$ (для фага λ) и 0,2 мл препарата фага (10^9—10^{11} БОЕ/мл).
2. Приготовьте контрольную пробу (вместо гидроксиламина добавлена стерильная вода).
3. Инкубируйте эти смеси при 37°С в течение 12—48 ч.
4. Периодически (примерно через каждые 6—8 ч) отбирайте пробы, разводите их $^1/_{100}$ холодной средой LBSE (среда LB, содержащая 1 М NaCl и 1 мМ ЭДТА). Через 1 ч разводите их в 2 раза средой для разведения фага λ и держите на холоду.
5. Каждую пробу оттитруйте на пермиссивных клетках-хозяевах. Через 24 ч инкубации с гидроксиламином выживаемость упадет до нескольких процентов, а в контрольных пробах она должна составлять 50—100%. Высевайте на чашки несколько таких разведений, чтобы образовалось 1000—3000 бляшек. Эти чашки можно будет использовать для определения частоты прозрачных бляшек. Разведения стабильнее, чем пробы в LBSE, так что оставьте разведения на холоду, чтобы потом можно было высеять их на много чашек.
6. Выделите мутантов фага. Для этого высейте на чашки с пермиссивным хозяином подходящие разведения (чтобы получилось ~100 бляшек на чашке). Уколом стерильными зубочистками отберите бляшки со свежих чашек (<18 ч) и переколите их на чашки с непермиссивным и пермиссивным хозяином (т. е. на свежеприготовленные чашки с соответствующими бактериями, высеянными в верхнем агаре). Часто оказывается желательным стерилизовать газон перед тем, как уколом отбирать чашки. Для этого чашку держат в течение примерно 10 мин в перевернутом виде над ванночкой с хлороформом.

II. Локализованный мутагенез (по котрансдукции)

1. Смешайте 1 мл буфера фосфат-ЭДТА, 1,5 мл стерильной воды, 2 мл гидроксиламина и 0,5 мл фага P22 ($2 \cdot 10^{11}$—

2·10^{12} БОЕ/мл), выращенного на донорном штамме с каким-нибудь маркером, по которому можно проводить отбор и который сцеплен с той областью, в которой намереваетесь специфически получать мутации (Hong and Ames, 1971).
2. Инкубируйте при 37°С в течение 20—50 ч.
3. Периодически (через каждые 6—8 ч) отбирайте пробы, разводя их в холодной среде LBSE.
4. Сразу же титруйте эти пробы, чтобы определить выживаемость и частоту мутаций, приводящих к прозрачным бляшкам (см. обсуждение).
5. Примерно через 30—50 ч (или когда выживаемость составит около 0,1—1%) отцентрифугируйте смесь в роторе Sorvall в течение 2 ч при 1700 об/мин, чтобы осадить фаг. Ресуспендируйте осадок в 1 мл среды LBSE, просто залив его на ночь (периодически встряхивая). (Не разбивайте осадок с помощью пипетки.)
6. Для трансдукции высейте около 0,1 мл мутагенизированного фага и 10^8 бактерий на чашку. Чашки должны быть со средой, которая является селективной для используемого селектируемого сцепленного маркера (например, Tet^R). Когда появятся колонии, их нужно перепечатать на чашки-реплики, чтобы выявить мутантов, несущих мутации, сцепленные с селектируемым маркером (например, Tn*10*).

Литература

Hong J.-S., Ames B. N., 1971. Localized mutagenesis of any specific small region of the bacterial chromosome, Proc. Nat'l. Acad. Sci., **68**, 3158.

Обсуждение

Гидроксиламин является мощным мутагеном, который можно использовать для обработки in vitro ДНК или ДНК-содержащих вирусов. Достоинство этого соединения состоит в том, что известны его механизм действия и специфичность. Он вызывает исключительно транзиции G⟶A. При правильном его применении получается очень высокое отношение мутаций к леталям. Поэтому им пользуются в тех случаях, когда возникает необходимость в сильном мутагенезе (например, при локализованном мутагенезе). Кроме того, следует иметь в виду, что тяжелый химический мутагенез часто приводит к образованию множественных мутаций. При работе с умеренными фагами степень мутагенеза удобно определять, выявляя среди выживших фагов мутантов, дающих прозрачные бляшки; имеет смысл следить за количеством мутантов, образующих прозрачные бляшки, даже в экспериментах по локализованному мутагенезу, так как просто

по выживаемости степень мутагенеза надежно установить нельзя.

I. А. В случае фага P22 $MgCl_2$ можно заменить на стерильную воду. Фаги λ (особенно те, у которых геном больше обычного) чувствительны к ЭДТА, и потому нужно добавлять $MgCl_2$. На холоду небольшое количество ЭДТА в среде LBSE не оказывает сильного влияния на выживаемость; при разведении в два раза в среде для разведения фага λ активность ионов Mg^{2+} восстанавливается.

Б. В тех случаях, когда мутагеном обрабатывают c^+-фаг, полезно определить частоту мутаций, приводящих к появлению прозрачных бляшек. Прозрачные бляшки выявляются даже на таких чашках, которые довольно плотно заполнены бляшками. При максимально возможном мутагенезе прозрачными оказывается около 5% бляшек.

В. Обычная схема выделения амбер-мутаций в генах фага включает высев мутагенизированного фага на чашку с газоном su^+ при 30°С и перекалывание образовавшихся бляшек на три чашки: с газоном su^- (которую инкубируют при 40°С), с газоном su^+ (которую инкубируют при 40°С) и еще на одну чашку с газоном su^+ (которую инкубируют при 30°С). Следуя такой схеме, можно выделить и амбер-мутантов, и температурочувствительных мутантов.

II. А. Важно провести очистку новых мутантов как можно раньше, чтобы освободить их от фаговых частиц. В случае фага P22 добавление ЭГТА в среду, используемую для идентификации мутантов, повысит вероятность выделения чувствительных к фагу нелизогенных мутантов.

Б. См. выше I-Б.

Литература

Hall D. H., Tessman I., 1966. T4 mutants unable to induce deoxycytidylate deaminase activity, Virology, **29**, 339.

Parkinson J. S., 1968. Genetics of the left arm of the chromosome of bacteriophage lambda, Genetics, **59**, 311.

Методика 9

Отбор делеционных мутантов фага λ

1. Получите на чашках препарат чувствительного к ЭДТА фага (см. обсуждение). Фаг элюируйте из агара раствором для

разведения фага λ *без магния.* Можно также развести обычный препарат фага в 5 раз средой для разведения фага λ без магния.

2. Разведите такой препарат фага, содержащий мало магния, в 10 мМ ЭДТА (рН 7). Если титр фага в препарате оказался слишком низким, чтобы его можно было разводить (ниже, чем 10^{10} частица/мл), то можно просто добавить в него ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ, учитывая при этом, конечно, содержание Mg^{2+} в препарате.
3. Инкубируйте в течение 30 мин при 48°C. Титр фага должен упасть в 10^4—10^5 раз. Если отбираются более протяженные делеции или если отбираются делеции среди малочувствительных препаратов фага, то инкубировать можно и при более высокой температуре.
4. Из обработанного препарата (содержащего не менее 10^5 частица/мл) отберите 0,1 мл и используйте этот объем для получения нового препарата фага на чашке. В методике 2 описано, как это сделать. Пользуйтесь чашками для фага λ.
5. Полученный новый препарат фага опять прогрейте с ЭДТА, как это делалось на этапах 1—3. Титр должен упасть не более чем в 10^3 раз.
6. Суспензию фага, прошедшего повторную обработку, высейте для получения отдельных бляшек. Их можно переколоть и каждую по отдельности проверить на наличие мутаций (как описано в методике 8). Можно также высеять суспензию на индикаторные чашки, которые позволяют прямо идентифицировать мутантов (например, на чашки Red, как это описано в методике 7).

Обсуждение

Для поддержания структурной целостности головки фага λ необходимы ионы магния. Удаление их хелатирующими соединениями, например ЭДТА или пирофосфатом, приводит к разрушению тех головок фага λ, в которых содержание ДНК больше, чем 96% от содержания ДНК в фаге дикого типа. Поэтому, действуя хелатирующими соединениями на препараты фага λ, можно отобрать из них естественно возникающие там делеции. Обычно для этого необходимо провести несколько циклов отбора, так как в любой популяции присутствуют природные варианты фага λ (λ*), устойчивые к хелатирующим соединениям не потому, что они содержат меньше ДНК, а по другим причинам (возможно, потому, что у них повышено содержание белка). Обычно при этих последующих циклах проводят высев на чашки с хелатирующим соединением. Более подробно об этой методике см. в работе Паркинсона и Хаски (Parkinson and Huskey, 1971). Необходимо начать работу с фага, геном

которого достаточно велик, чтобы он был чувствителен к таким хелатирующим соединениям, как ЭДТА. Проще всего определить это эмпирическим путем с помощью чашек с ЭДТА. Чтобы проверить фаг, нанесите его штрихом на газон *E. coli* на чашке с триптиказой и ЭДТА (1 мМ). (В зависимости от партии триптиказы или агара необходимая концентрация ЭДТА может варьировать.) Используйте верхний агар также с триптиказой и ЭДТА. Параллельно с такой проверкой фага на среде с ЭДТА нанесите фаг штрихом и на обычные чашки для фага λ с верхним агаром для этого фага. На каждую чашку нанесите и штрихи контрольных фагов λ^+ (дикий тип), и λ *c*I857 *b*515 *b*519 *nin*5 *int*am29. Сравните размеры бляшек, появившихся после инкубации в течение ночи при 42°C. Чувствительный к ЭДТА фаг образует крошечные бляшки (или вообще не образует их). Важно проводить проверку именно путем рассева до отдельных бляшек, так как на основании спот-теста надежных выводов сделать нельзя.

Литература

Parkinson J. S., Huskey R. J., 1971. Deletion mutants of bacteriophage lambda. Isolation and initial characterization, J. Mol. Biol., **56**, 369.

Методика 10

Тесты на рекомбинацию и комплементацию фага in vivo

I. Стандартное скрещивание (для определения частоты рекомбинации или для создания рекомбинанта)

1. Вырастите ночную культуру бактериального штамма, пермиссивного для обоих фагов, которые вы будете скрещивать. Определите точный титр каждого из этих фагов (методика 1).
2. Разведите культуру $^1/_{1000}$ в среде TYM (если скрещиваете фаги λ) или в среде LB (если скрещиваете фаги P22) и подрастите культуру до плотности не выше, чем $2 \cdot 10^8$ клетка/мл (по Клетту, это 40; можно пользоваться также камерой Петрова — Хауссера).

3. Осадите клетки центрифугированием и ресуспендируйте их в холодной среде для разведения фага λ (если скрещиваете фаги λ) или в забуференном физиологическом растворе (если скрещиваете фаги P22). Ресуспендируйте таким образом, чтобы получилась плотность $4 \cdot 10^8$ клетка/мл.
4. Каждый из родительских фагов разведите до титра $4 \cdot 10^9$ фаг/мл. Смешайте их вместе в соотношении 1 : 1.
5. 0,2 мл смеси фагов добавьте к 0,2 мл суспензии клеток и проведите адсорбцию в течение 15 мин при 37°C.
6. Разведите в 10^4 раз в бульоне LB (но не TYM), предварительно прогретом до 37°C, и инкубируйте в течение 90 мин. После этого добавьте 2 капли хлороформа.
7. Оттитруйте при условиях, которые пермиссивны для обоих родительских фагов (чтобы определить полный титр потомства), и при условиях, непермиссивных ни для одного из фагов-родителей (чтобы определить титр рекомбинатов). Частота рекомбинации = (2×титр в непермиссивных условиях): (полный титр потомства).

II. Комплементационный тест по размножению фага

1. Вырастите ночную культуру хозяина, непермиссивного для мутантного фага. Следуйте затем этапам 1—6 стандартного скрещивания, следя за тем, чтобы во время этапов 5 и 6 поддерживались непермиссивные условия.
2. Определите полный титр потомства на пермиссивной клетке-хозяине в пермиссивных условиях.

III. Спот-тест на комплементацию мутантов фага (λ или P22)

Можно быстро проверить попарно мутантов фага на комплементацию, проведя спот-тест на чашках, засеянных непермиссивной клеткой-хозяином. Удобно проводить адсорбцию одного из фагов, тестируемых на комплементацию, на непермиссивных клетках в верхнем агаре, дать агару застыть на чашке, а затем сверху нанести капли другого фага (фагов). Достоверность спот-теста сильно возрастает, если по очереди адсорбировать на клетках каждый из исследуемых мутантов, так что для каждой пары мутантов проводят реципрокные пары тестов. Часто бывает полезно тестировать несколько разведений каждого фага.

1. Вырастите ночную культуру непермиссивной клетки-хозяина в бульоне LB.
2. Разведите клетки $^1/_{50}$ в среде TYM (в случае фага λ) или LB (в случае фага P22) и подрастите культуру до плотности не выше $2 \cdot 10^8$ клетка/мл.

3. К 0,2 мл клеток добавьте 10^7—10^8 частиц того фага, который будете тестировать. Добавьте 2,5 мл расплавленного верхнего агара для фага λ и высейте на чашку для фага λ. Предварительная адсорбция необязательна. В качестве контроля приготовьте также чашку с бактериальным газоном без фага.
4. После того как агар затвердеет (примерно через 10 мин), нанесите стерильным капилляром капли объемом около 20—50 мкл различных препаратов фага, которые должны тестироваться.

   Лучшие результаты получаются при использовании ряда разведений каждого препарата. Разведения 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} препаратов фага с титром около 10^{10} фаг/мл перекрывают нужный диапазон. На каждой чашке используйте в качестве контролей фаг дикого типа. Другим контролем на каждой чашке служит фаг, адсорбированный на клетках газона.
5. Инкубируйте в течение ночи при 37°С (или при более высокой температуре, если в тесте участвует температурочувствительный мутант).

   Комплементация произошла, если даже при высоких разведениях есть пятно лизиса, кроме, конечно, того пятна, которое имеется и в соответствующем контроле. В высокой концентрации (низком разведении) фаг иногда может убивать и такие клетки, на которых он не может развиваться. От такого типа неразберихи могут уберечь лишь контроли. Всегда полезно использовать несколько разведений.

   Результаты спот-теста являются лишь ориентиром. В большинстве случаев, чтобы подтвердить наличие комплементации, на самом деле необходимо следить за размножением фага после совместного заражения клеток в жидкой культуре.

Обсуждение

I. 1. Для скрещивания два фага с разными генотипами адсорбируют на одной и той же *пермиссивной* бактерии-хозяине. При этом можно использовать любые клетки, лишь бы у них не была повреждена система рекомбинации. Штамм C600 содержит *supE*, а штамм BNN45 содержит и супрессор *supE*, и супрессор *supF* и, кроме того, является *hsdR*⁻ *hsdM*⁺. Поэтому в последней клетке-хозяине можно проводить скрещивание амбер-мутантов немодифицированного фага.
   2. По-видимому, рекомбинация выше в экспоненциально растущих клетках. Усилить рекомбинацию можно также, облучив клетки низкими дозами ультрафиолета до того, как будет проведено скрещивание фагов.

3. Концентрирование клеток обеспечивает хорошую адсорбцию фага.
4. (Этапы 4 и 5); цель состоит либо в определении частоты рекомбинации, либо в создании рекомбинантного штамма. И в том и в другом случае используется одна и та же методика. В обоих случаях очень важно, чтобы условия были как можно более пермиссивными. Искажения при скрещиваниях, обусловленные селекцией, могут легко привести к невозможности интерпретировать полученные результаты или к слишком низкой частоте появления искомых рекомбинатов. Очень важным фактором является множественность заражения. Она должна быть достаточно высокой, чтобы каждую клетку заразило примерно одинаковое число того и другого фага, но не настолько высокой, чтобы препятствовать размножению фага. Обычно используют множественность заражения от пяти до семи фагов каждого из родительских типов на клетку. Рекомендуется определять титры фагов за день-два до проведения скрещивания.
5. (Этап 6); клетки разводят для того, чтобы обеспечить хорошую аэрацию при последующем росте и чтобы предотвратить реадсорбцию после лизиса клеток. Использование на этой стадии бульона LB (который не содержит мальтозы) приводит к дополнительному подавлению реадсорбции потомства фага λ после лизиса.
6. (Этап 7); критериями успешного скрещивания служат выход фага (должен быть выше 20), равная передача родительских маркеров и хорошая адсорбция внесенного фага. Обычно, чтобы получить частоты рекомбинации при скрещиваниях, определяют все эти параметры. Если частоты рекомбинации низки, то важно знать частоту ожидаемых ревертантов. Таким удобным контролем служит заражение каждым из скрещиваемых фагов по отдельности.

II. 1. Тест на комплементацию в жидкой среде проводят почти так же, как и скрещивания, за исключением того, что в качестве клеток-хозяев при этом выступает *непермиссивный* штамм бактерий. Здесь также важно заражать клетки равным количеством фагов (множественность заражения 5—10), определять количество неадсорбированного фага и число клеток в момент инфицирования, а также и выход фага, что в данном случае и составляет цель эксперимента. Чтобы понизить фон неадсорбированного фага, часто пользуются сывороткой против него. При комплементации в жидкой среде очень важно ставить в качестве контроля заражение каждым из родительских фагов по отдельности, а также определять частоту реком-

GEDANKEN EXPERIMENT



Для «мыслителей», которые не любят работать в лаборатории, мысленные эксперименты (gedanken experiments) — это выход из положения. Некоторые мысленные эксперименты приносят реальную пользу, а о некоторых лучше бы забыть.

бинации при непермиссивных условиях, так как реверсии и рекомбинация могут привести к неожиданно высоким выходам.

При комплементации важно, чтобы адсорбция и заражение проходили при строго *непермиссивных* условиях. Например, при тесте на комплементацию температурочувствительного мутанта и *амбер-мутанта* используют хозяина su^- и высокую температуру. Поэтому нужно внимательно следить за температурой, при которой происходят адсорбция и рост. В качестве контроля необходимо проводить заражение фагом дикого типа и заражение по отдельности каждым использованным мутантом в тех же самых условиях.

2. Титровать следует на хозяине, *пермиссивном* для обоих родительских фагов (например, на клетках su^+ при 25°C

в случае комплементации между *температурочувствительным* мутантом и *амбер*-мутантом фага). Выводы основаны на сравнении выхода при совместном заражении с выходом при заражении каждым мутантом по отдельности и с выходом при заражении фагом дикого типа.

Методика 11

Выделение ДНК из фага λ

I. Формамидный метод

А. 1. Смешайте 1 объем фага в растворе CsCl с плотностью, равной плавучей плотности фага, 10 мМ $MgSO_4$, 10 мМ трис (pH 8), и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА с $^1/_{10}$ объема 2 М трис и 0,2 М Na_2-ЭДТА (pH 8,5) в полипропиленовой пробирке от микрофуги.

2. Добавьте 1 объем формамида и оставьте при комнатной температуре на время от 30 мин до нескольких часов.

3. Добавьте 1 объем H_2O.

4. Добавьте 6 объемов этанола при комнатной температуре.

5. Осадите ДНК, проведя центрифугирование в микрофуге в течение 2 с.

6. Слейте надосадочную жидкость. Сполосните осадок 70%-ным этанолом.

7. Слейте раствор, которым промывали осадок. Сухой осадок растворите в 10 мМ трис (pH 7,5) и 1 мМ Na_2-ЭДТА.

8. Для длительного хранения повысьте концентрацию соли.

Б. 1. Смешайте фаг в растворе CsCl с плотностью, равной плавучей плотности фага, 10 мМ $MgSO_4$, 10 мМ трис (pH 8), и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА с $^1/_{10}$ объема 0,2 М Na_2-ЭДТА.

2. Диализуйте против 50% раствора формамида, 0,2 М трис (pH 8,5) и 0,02 М Na_2-ЭДТА при комнатной температуре в течение 12—24 ч.

3. Диализуйте против буфера для хранения ДНК (0,1 М NaCl, 0,05 М трис (pH 8,5) и 0,01 М Na_2-ЭДТА). Если будете расщеплять препарат ДНК эндонуклеазой *Eco*RI, то диализуйте против 0,1 М NaCl, 0,05 М трис (pH 7,4) и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА.

4. Необходимо четыре раза сменять буфер в объеме, в 200 раз превышающем объем диализуемого раствора.

Литература

Thomas M., Davis R. W., 1974. Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with *Eco*RI restriction endonuclease, J. Mol. Biol, 91, 315.

St. John T. (личное сообщение).

Обсуждение

Обычно ДНК фага λ выделяют из препарата фага фенольной экстракцией, проводя затем экстракцию эфиром, чтобы удалить растворенный фенол. Нами обнаружено, что при использовании формамидного метода полученная ДНК содержит меньше одноцепочечных разрывов и обладает большей инфекционностью. Возможно, что при этом не удаляются фаговые белки, остающиеся в виде «теней» бактериофага. Мы не наблюдали, однако, чтобы при использовании таких препаратов ДНК каким-либо образом ингибировалась работа большинства ферментов. По-видимому, при обработке формамидом ДНК фага выпрыскивается через хвостовой отросток.

А. 1. Na_2-ЭДТА добавляют для того, чтобы хелатировать ионы Mg^{2+}.

2. Выпрыскивание ДНК происходит, очевидно, очень быстро. Однако длительный контакт с формамидом, по-видимому, не оказывает на ДНК повреждающего действия.

3. Воду добавляют для того, чтобы CsCl не выпал в осадок после добавления этанола.

4. (Этапы 4 и 5); ДНК быстро образует преципитат, и обычно для этого не требуется охлаждать раствор. Если центрифугирование не будет таким кратковременным, то ДНК трудно будет ресуспендировать.

5. (Этап 6); осадок споласкивают, чтобы удалить остатки CsCl и формамида.

6. (Этапы 7 и 8); ДНК быстрее всего растворяется при очень низкой концентрации соли. Однако при длительном хранении (в течение месяцев) ДНК меньше деградирует при более высоких концентрациях соли и Na_2-ЭДТА.

Б. Эта методика аналогична приведенной выше, но в данном случае добавление и удаление формамида проводят с помощью диализа. При этом не требуется осаждения этанолом. В формамиде могут содержаться примеси, которые не удаляются при осаждении спиртом. Очевидно, все то, что в процессе диализа может поступать внутрь мешка, может при последующем диализе удаляться оттуда.

Эта методика, по-видимому, лучше всего подходит для получения больших количеств ДНК фага λ, так как большой осадок ДНК после осаждения этанолом может растворяться плохо.

II. Быстрый метод выделения ДНК фага λ

1. Получите обычный препарат фага λ на чашках, используя среды с агарозой.
2. Охладите чашки. Налейте на них по 5 мл холодного буфера для разведения фага λ. Оставьте чашки на ночь при 4°С.
3. Пипеткой перенесите 0,4 мл осветленного лизата в пробирку на 1,5 мл от микрофуги. Оставшийся лизат можно сохранить для целей культивирования.
4. Добавьте 1 мкл диэтилоксидиформата при комнатной температуре.
5. Добавьте 10 мкл 10%-ного раствора ДСН (додецилсульфата натрия). Перевернув пробирку, перемешайте содержимое.
6. Добавьте 50 мкл раствора 2 *М* трис и 0,2 *М* Na_2-ЭДТА (pH 8,5). Перемешайте.
7. Инкубируйте в течение 5 мин при 70°С, прикрыв сверху крышкой.
8. Добавьте 50 мкл 5 *М* ацетата калия.
9. Охладите пробирки и поместите их в лед, по крайней мере на 30 мин.
10. Осадите преципитат центрифугированием в микрофуге в течение 15 мин.
11. Надосадочную жидкость слейте в новую пробирку.
12. Заполните пробирку этанолом при комнатной температуре.
13. Отцентрифугируйте в микрофуге в течение 5 мин.
14. Слейте надосадочную жидкость. Переверните пробирку и поставьте ее на бумажное полотенце, чтобы позволить жидкости стечь. *Вся* жидкость должна либо стечь, либо ее нужно испарить, однако нельзя пересушить осадок.
15. Растворите осадок ДНК в 50 мкл раствора:
    10 м*М* трис (pH 7,5),
    1 м*М* Na_3-ЭДТА,
    10 мкг/мл РНКазы А.
16. Обычно достаточно 5 мкл на одну пробу по рестрикции и на одну дорожку в геле.

Обсуждение

1. Неочищенный агар сильно ингибирует большинство рестриктирующих эндонуклеаз и других ферментов, работающих на ДНК. Это ингибирующее действие может быть обусловлено

сульфонированными углеводородами. Выделяемая этим методом ДНК фага λ происходит как из частиц фага, так и из свободной, выделенной в среду ДНК. После расщепления эндонуклеазой ДНК *E. coli* распределяется при электрофорезе по всей полоске гелия. Это позволяет увидеть лишь полосы ДНК фага λ, которых в молярном отношении оказывается больше.

2. При охлаждении чашек повышается твердость агарозы. Это предотвращает суспендирование агарозы при наслаивании и сборе жидкости с чашек на следующем этапе. Фаг и фаговая ДНК диффундируют из верхнего слоя агарозы в наслоенную жидкость. При охлаждении чашек и использовании холодного буфера для разведения фага λ снижается также деградация ДНК после того, как она диффундирует в наслоенную жидкость.
3. С агарозной чашки, как и с обычной чашки, получается 4 мл препарата фага с титром 10^{10} частиц фага в 1 мл. В 0,4 мл такого препарата содержится столько фага и фаговой ДНК, сколько нужно примерно на десять полосок в геле.
4. Диэтилоксидиформат добавляют, чтобы инактивировать нуклеазы. На начальных этапах нуклеазы, по-видимому, ингибируются агарозой, так как при 37° С ДНК не деградирует до тех пор, пока ее вместе с наслоенной жидкостью не снимут с чашки.
5. ДСН денатурирует белки и приводит к выделению ДНК из фаговых частиц.
6. Трис добавляют для того, чтобы забуферить раствор, так как диэтилоксидиформат вызывает образование около 30 мМ CO_2. Na_2-ЭДТА добавляют, чтобы хелатировать ионы Mg^{2+} в буфере для разведения фага λ.
7. Смесь нагревают до полной денатурации белка.
8. Добавление ацетата калия приводит к выпадению осадка денатурированных белков с калиевой солью додецилсульфата. Ацетат калия добавляют перед тем, как охладить пробирки, в результате чего преципитат образуется медленнее и оказывается мельче. Такие преципитаты легче удалять с помощью центрифугирования.
9. Охлаждение обеспечивает полноту преципитации.
10. Если часть преципитата при центрифугировании не села на дно, то резко встряхните пробирку, чтобы удалить захваченный преципитатом воздух, и проведите повторное центрифугирование.
11. Постарайтесь не терять осадка. Если надосадочная жидкость оказалась мутной, то проведите повторное центрифугирование.
12. Высокомолекулярная ДНК в полученном препарате легко осаждается этанолом. Препарат не следует охлаждать, так

как при низких температурах могут выпасть в осадок и нежелательные примеси.

13. (Этапы 13 и 14); ацетат калия очень хорошо растворим в этаноле, так что соль в осадок не выпадает. Для удаления растворимых примесей и ацетата калия важно, чтобы из пробирки стекла вся жидкость. Если жидкость из пробирки не стекает, ее можно удалить тонким кончиком фитиля из хлопчатобумажной ткани или ваты.
14. (Этап 15); РНКазу добавляют, чтобы удалить примесь РНК, которая может ингибировать многие ферменты, работающие на ДНК. Расщепленную РНК можно не удалять.

Литература

Cameron J. R., Philippsen P., Davis R. W., 1977. Analysis of chromosomal integration and deletions of yeast plasmids, Nucleic Acids Res., **4**, 1429.

III. Выделение ДНК из термоиндуцибельных лизогенов *S*am7

1. Рассейте лизогенные бактерии для получения отдельных колоний. Инкубируйте при 30—32°С.
2. Проверьте несколько колоний на рост при 32 и 42°С.
3. Отберите с чашки, выращенной при 32°С, такую колонию, которая не растет при 42°С. Вырастите ночную культуру в бульоне LB при 32°С.
4. Засейте 10 мл этой ночной культуры в 1000 мл бульона LB (pH 7,5—8).
5. Растите при 32°С до тех пор, пока A_{600} не достигнет 0,6 (около 3—4 ч).
6. Нагрейте до 42—43°С и продолжайте выращивать при этой температуре в течение по крайней мере 15 мин.
7. Выращивайте при 37°С в течение еще 3 ч (поддерживайте pH в пределах 7,5—8; если среда закисляется, то добавьте NaOH).
8. Добавьте 5 мл $CHCl_3$ и встряхивайте 10 мин при 37°С (лизис наступает через несколько минут).
9. Центрифугируйте в роторе JA-7,5 (7000 об/мин, 5 мин), чтобы осадить обломки клеток.
10. Осадите фаг центрифугированием в роторе JA-7,5 (7000 об/мин, 15 ч).
11. Осадок фага ресуспендируйте в 9 мл 4 M CsCl (ρ=1,5), 10 мМ $MgSO_4$ и 0,1 мМ Na_2-ЭДТА.
12. Заполните две пробирки от ротора Beckman SW50.1. Центрифугируя при 30 000 об/мин (20°С) в течение по крайней мере 16 ч, сконцентрируйте фаг в полосу.

13. Проколов пробирку сбоку иглой номер 25 от шприца для инъекций, отберите полосу фага. Из каждой пробирки отбирайте 0,5 мл.
14. Храните фаг в растворе CsCl при 4°C. (При длительном хранении ДНК лучше всего сохраняется в фаге.)

Хранение клеток. Вырастите ночную культуру при 32°C, добавьте диметилсульфоксид до 7% (по объему), храните ее замороженной при —70°C.

IV. Разделение цепей ДНК фага λ

А. *Денатурирующий раствор*

1. В полиалломерную пробирку от центрифуги Beckman размером $1/2 \times 2$ дюйма при 0°C внесите 1,0 ед. A_{260} фага λ (50 мкг ДНК). (Максимальный объем 200 мкл; минимальное поглощение препарата $A_{260}=5,0$.)
2. Добавьте 200 мкл H_2O (минус объем фага).
3. Добавьте 5 мкл 1 М Na_4-ЭДТА.
4. Добавьте 5 мкл 4%-ного раствора N-лауроилсаркозината натрия в 10^{-2} М трис (pH 7,5).
5. Добавьте 35 мкл 1 М NaOH.
6. Оставьте на 10—30 мин при комнатной температуре.

Б. *Раствор для закаливания*

1. Налейте 40 мкл 2М трис-HCl в пробирку от микрофуги на 1,5 мл.
2. Добавьте 1 ед. A_{260} poly(rUG) (например, 7 мкл раствора с $A_{260}=175$) в H_2O.
3. Добавьте 245 мкл H_2O (минус объем poly (rUG)). Суммарный объем растворов А и Б равен 0,530 мл.
4. Поместить оба раствора (А и Б) в лед и охладите до 0°C. Пользуясь автоматической пипеткой, впрысните раствор для закаливания (Б) и раствор ДНК (А) в полиалломерной пробирке, помещенной в смеситель Vortex, включенный на положение 3. Перенесите пробирку обратно в лед.

В. Добавьте 2,13 мл 7,29 М CsCl ($\rho^{25}=1,91$; $\eta^{25}=1,4188$). Центрифугирование: 30 000 об/мин в роторе Beckman SW 50.1 при 10°C в течение 48 ч.

Фракционирование: фракции по 8 капель, всего 40 фракций.

Литература

Davis R. W., Hyman R. W., 1971. A study in evolution: The DNA base sequence homology between coliphages T1 and T3, J. Mol. Biol., **62**, 287.

Summers W. C., Szybalski W., 1968. Totally asymmetric transcription of coliphage T7 in vivo: Correlation with polyG binding sites, Virology, **34**, 9.

Методика 12

Выделение плазмидной и бактериальной ДНК

I. Выделение больших количеств плазмидной ДНК из *E. coli*

1. Начинайте с отдельной колонии *E. coli,* проверенной на наличие плазмиды (Tet^R, Amp^R, Cam^R и т. п.). В колбе на 1 л вырастите при интенсивном встряхивании до насыщения 100 мл культуры в бульоне LB. Выход составляет ~50 мкг. Приведенная ниже методика выделения рассчитана на одну пробирку от ротора SW50.1. (Объемы при использовании центрифужных пробирок для других роторов, см. на стр. 89).
2. Осадите клетки центрифугированием в течение 5 мин при 8000 об/мин и 5°С.
3. Ресуспендируйте клетки в 1/4 объема 10 мМ трис (pH 8,5) и 1 мМ Na_3-ЭДТА. Вновь осадите клетки центрифугированием.
4. Ресуспендируйте клетки в 2 мл 15%-ного раствора сахарозы, 0,05 М трис (pH 8,5) и 0,05 М Na_2-ЭДТА, содержащего 1 мг/мл свежерастворенного лизоцима. Перенесите в центрифужную пробирку на 10 мл, которую можно центрифугировать при 20 000 об/мин. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10—60 мин.
5. Добавьте 2 мл раствора тритона (0,1% тритона Х-100 (Sigma), 0,05 трис (pH 8,5) и 0,05 М Na_2-ЭДТА). Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10—20 мин. Если клетки не лизируют и суспензия не станет очень вязкой, то инкубируйте 30 мин при 37°С.
6. Центрифугируйте в течение 1 ч в роторе JA-21 при 20 000 об/мин и 5°С.
7. Наклоняя пробирку, сливайте надосадочную жидкость в мерную аналитическую пробирку до тех пор, пока не дойдете до очень вязкого материала над осадком. Обычно этот вязкий материал занимает менее последнего сантиметра осветленной надосадочной жидкости. Иногда оказывается, что надосадочная жидкость невязкая вся вплоть до самого осадка. В таком случае соберите ее всю.
8. Доведите объем до 4,0 мл. Добавьте 3,7 г сухого CsCl и 0,4 мл раствора 10 мг/мл бромистого этидия (Sigma). Показатель преломления должен находиться между 1,390 и 1,396, а плотность должна быть равна 1,59 г/мл. Плотность является более надежным показателем и ее легко определить, взвесив известный объем жидкости. Получившаяся в результате смесь как раз заполнит одну пробирку от ротора SW 50.1.

9. Центрифугируйте в течение 48 ч при 35 000 об/мин и 20°С.
10. Если осветить пробирку длинноволновым УФ-светом, то можно увидеть полосы. Нижняя полоса содержит ковалентно-замкнутую кольцевую ДНК. Проткнув пробирку сбоку иглой номер 20 или 21 от шприца для инъекций, отберите ДНК.
Релаксированная ДНК; $\rho=1{,}55$ г/мл
Нативная суперализованная ДНК: $\rho=1{,}59$ г/мл

При выделении из больших объемов культуры используйте угловые роторы или роторы с вертикальным расположением пробирки.

Ротор	50 Ti	60 Ti	60 Ti	60 Ti	60 Ti
Объем культуры (л)	0,1	0,8	1,5	3	6
Число используемых пробирок	1	1	2	4	8
Раствор лизоцима (мл)	4,5	13,5	27	54	108
Раствор тритона (мл)	4,8	14,5	29	58	116
Надосадочная жидкость (мл)	8,7	27,5	55	110	220
CsCl (г)	8,3	26,13	52,26	104,5	209
Раствор бромистого этидия (мл)	0,9	2,75	5,5	11	22

Обсуждение

1. При длительном хранении на чашках, в столбиках или в бульоне клетки *E. coli* теряют многие плазмиды, даже мультикопийные. Поэтому целесообразно непосредственно перед тем, как проводить выделение больших количеств плазмидной ДНК, проверить присутствие плазмиды. Однако, чтобы гарантировать поддержание плазмиды в этой культуре, не обязательно выращивать культуру, из которой будете выделять плазмиду, в присутствии используемого для отбора питательного вещества или лекарственного препарата.
2. (Этапы 2 и 3); эти этапы нужны для того, чтобы отмыть клетки от культуральной среды и других растворимых соединений (Mg^{2+}, солей, буферов и т. п.), которые могут мешать на следующих этапах.
3. (Этап 4); Na_2-ЭДТА используется для удаления ионов Ca^{2+} из клеточной стенки, что делает ее более восприимчивой к действию лизоцима. Лизоцим довольно неустойчив при щелочных значениях рН, и поэтому рекомендуется пользоваться свежеприготовленным раствором. При рН 4—5 лизоцим стабилен в течение нескольких недель при 5°С, а при комнатной температуре — в течение нескольких дней. Этот фермент следует растворять в холодной дистиллированной воде.

4. (Этап 5); тритон X-100 представляет собой неионный детергент и вызывает лизис обработанных лизоцимом клеток. При этом основная часть клеточной ДНК остается связанной с обломками клеток и при центрифугировании оказывается в осадке. Чтобы эта клеточная ДНК не вышла в раствор, нужно соблюдать осторожность и не слишком интенсивно перемешивать.
5. (Этап 6); осадок получается несколько студенистым, а надосадочная жидкость — желтоватой. Если надосадочная жидкость оказывается прозрачной и бесцветной, а осадок — компактным и непрозрачным, то значит, клетки не лизировали. Если получилось именно так, то ресуспендируйте осадок, прогрейте пробирку в течение 30 мин при 65°С и повторите этап 6.
6. (Этап 7); плазмидная ДНК должна быть освобождена из обломков клеток и должна находиться в надосадочной жидкости. Вязкий материал представляет собой, по-видимому, клеточную ДНК. Желательно, чтобы его попало в сливаемую жидкость как можно меньше.
7. (Этап 8); большинство препаратов CsCl влажные, и поэтому следует установить эмпирическим путем, сколько добавлять невысушенного CsCl.
8. (Этап 9); при равновесном центрифугировании ДНК собирается в полосу примерно за 48 ч. Однако, для того чтобы РНК достигла своей равновесной полосы, необходимо больше времени. Поэтому чем дольше длится центрифугирование, тем меньше в получаемом препарате ДНК оказывается примеси РНК.
9. (Этап 10); используется длинноволновый ультрафиолет, так как облучение коротковолновым УФ-светом приводит к образованию в ДНК тиминовых димеров и поперечных сшивок.

II.А. Быстрый метод выделения плазмидной и (или) бактериальной ДНК из колоний или жидких культур

1. Пользуясь плоскими зубочистками, соскребите колонии с агарозных чашек в центрифужные пробирки на 1,5 мл. Если исходите из жидкой культуры, то отцентрифугируйте 0,1 мл культуры, выросшей до насыщения. Ресуспендируйте осадок в 0,5 мл раствора:
   50 мМ трис (pH 8,5),
   50 мМ Na_2-ЭДТА,
   15% сахарозы,
   1 мг/мл лизоцима (добавляется непосредственно перед использованием).
2. Оставьте на 10 мин при комнатной температуре.

3. Добавьте 1 мкл диэтилоксидиформата при комнатной температуре.
4. Добавьте 10 мкл 10%-ного раствора ДСН. Перемешайте, перевертывая пробирку.
5. Для получения бактериальной ДНК прогрейте в течение 5 мин при 70°С под крышкой. При выделении только плазмидной ДНК препарат не прогревайте.
6. Добавьте 50 мкл 5 М ацетата калия.
7. Охладите пробирки и держите их во льду в течение по крайней мере 30 мин.
8. Осадите преципитат центрифугированием в микрофуге в течение 15 мин.
9. Надосадочную жидкость слейте в новую пробирку.
10. Долейте пробирку доверху этиловым спиртом при комнатной температуре.
11. Осадите преципитат центрифугированием в микрофуге в течение 5 мин.
12. Слейте надосадочную жидкость. Переверните пробирку и поставьте ее на бумажное полотенце, чтобы жидкость стекла из нее. Должна стечь *вся* жидкость. Ее можно также выпарить, но нельзя пересушить осадок.
13. Растворите выпавшую в осадок ДНК в 50 мкл раствора:
    10 мМ трис (рН 7,5),
    1 мМ Na_3-ЭДТА,
    10 мкг/мл РНКазы А.

Полученного количества ДНК обычно достаточно для двух нанесений на гель. Суперспирализованную ДНК после этапа 13 можно прямо использовать для электрофореза в геле. Все процедуры можно проводить при комнатной температуре, за исключением этапа 7. На этом этапе необходима длительная инкубация при 0°С, а также длительное центрифугирование, чтобы осадить все обломки клеток и преципитат комплекса белка с додецилсульфатом калия.

Обсуждение

1. (Этапы 1 и 2); неочищенный агар сильно ингибирует активность большинства рестриктирующих эндонуклеаз и других ферментов, работающих на ДНК. Этим ингибитором, возможно, являются содержащиеся в нем сульфонированные углеводороды. При соскребывании колоний с обычных чашек с агаром иногда можно захватить столько этого ингибитора, что на выделенной ДНК не смогут работать ферменты.

   При использовании чашек с агарозой таких осложнений не возникает. Не обязательно использовать всю колонию. Обычно для выделения достаточно примерно одной четверти колонии.

2. (Этап 3), диэтилоксидиформат добавляют, чтобы инактивировать нуклеазы. Если нужна биологически активная ДНК, то этот этап следует опустить.
3. (Этап 4), ДСН лизирует сферопласты и денатурирует белки.
4. (Этап 5), при нагревании длинная бактериальная ДНК высвобождается из других больших клеточных компонентов и уже не осаждается при центрифугировании на этапе 8.
5. (Этап 6); ацетат калия используется для осаждения додецилсульфата и комплексов белков с додецилсульфатом. Чтобы преципитаты образовывались медленно, ацетат калия следует добавлять до того, как охлаждать пробирки.
6. (Этап 7); для полного осаждения додецилсульфата калия достаточно охладить пробирки и держать их на холоду в течение 30 мин.
7. (Этап 8); если преципитат додецилсульфата калия образуется слишком быстро, то он может оказаться хлопьевидным или захватить пузырьки воздуха. В результате могут возникнуть трудности с его осаждением. Чтобы полностью осадить додецилсульфат калия, достаточно центрифугирования в течение 15 мин. Если же преципитат все-таки остался в надосадочной жидкости, то перенесите ее в новую пробирку, энергично встряхните и повторите этап 8.
8. (Этап 9); не выбрасывайте преципитат. Если надосадочная жидкость оказалась мутной, то просто повторите центрифугирование.
9. (Этапы 10 и 11); препарат содержит ДНК и РНК. Он легко осаждается этиловым спиртом. Охлаждать препараты не следует, так как при пониженных температурах может происходить преципитация нежелательных примесей.
10. (Этап 12); ацетат калия очень хорошо растворим в этаноле, так что соль в осадок не выпадет. Чтобы удалить растворимые примеси и ацетат калия, нужно слить всю жидкость. В этих же целях можно сполоснуть пробирки 70%-ным этанолом. Если жидкость не стекает с пробирки, ее можно промокнуть фитилем из ткани или ваты, не касаясь осадка ДНК.
11. (Этап 13); РНКазу используют, чтобы удалить примесь РНК, которая может подавлять активность ферментов, работающих на ДНК. Гидролизованную РНК удалять необязательно.
12. (Этап 14); иногда выделенная таким способом ДНК не расщепляется рестриктирующими эндонуклеазами. В таком случае ее можно дополнительно очистить, проведя второе осаждение этанолом. Добавьте 200 мкл 10 мМ трис (pH 7,5), 1 мМ Na_3-ЭДТА и 50 мкл 5 М ацетата калия. Если при этом образовался преципитат, то отцентрифугируйте его и перенесите надосадочную жидкость в новую пробирку. До-

бавьте 0,5 мл этанола и поместите на 20 мин в лед. Так как РНК уже удалена из препарата, то ДНК преципитирует хуже. Повторите этапы 11, 12 и 13.

II.Б. Быстрый метод выделения плазмидной ДНК из 10 мл жидкой культуры

1. Вырастите клетки до насыщения в 10 мл бульона LB с 0,4% глюкозы. Если необходимо, то добавьте используемый для отбора лекарственный препарат.
2. Отцентрифугируйте клетки прямо в той пробирке, в которой выращивали культуру, или в центрифужной пробирке на 10 мл. Ресуспендируйте осадок в 1,4 мл 10 мМ трис (pH 8,5) и 1 мМ Na_3-ЭДТА.
3. Перенесите суспензию клеток в пробирку от микрофуги на 1,5 мл и центрифугируйте в течение 30 с.
4. Ресуспендируйте в 0,4 мл раствора, содержащего 15% сахарозы, 50 мМ трис-HCl и 50 мМ Na_2-ЭДТА (pH 8,5). Тщательно перемешайте в смесителе Vortex.
5. Поместите в лед и добавьте 0,1 мл свежеприготовленного раствора лизоцима с концентрацией 5 мг/мл в приведенном выше буфере при 0°C.
6. В течение 10 мин держите во льду, периодически осторожно переворачивая пробирку.
7. Добавьте 0,3 мл раствора, содержащего 0,1% тритона X-100, 50 мМ трис-HCl и 50 мМ Na_2-ЭДТА (pH 8,5) при 0°C.
8. В течение 10 мин держите пробирку во льду, периодически осторожно переворачивая.
9. Центрифугируйте в течение 2 мин в микрофуге, помещенной в холодную комнату.
10. Слейте надосадочную жидкость в новую пробирку от микрофуги.
11. Добавьте 2 мкл диэтилоксидиформата, перетрясите.
12. Прогрейте в течение 15 мин при 70°C, 15 мин подержите во льду, после чего центрифугируйте в течение 2 мин в микрофуге.
13. Слейте надосадочную жидкость в новую пробирку от микрофуги.
14. Долейте пробирку доверху этанолом при комнатной температуре.
15. Осадите преципитат, центрифугируя 5 мин в микрофуге.
16. Слейте надосадочную жидкость. Пробирку переверните на бумажное полотенце, чтобы дать жидкости стечь. Вся жидкость должна стечь. Ее можно выпарить, но нельзя пересушить осадок.
17. Растворите осадок ДНК в 50 мкл раствора:
    10 мМ трис (pH 7,5),

1 мМ Na_3-ЭДТА,
10 мкг РНКазы А.

На полосу агарозного геля достаточно наносить 5 мкл такого препарата. Полученная таким способом ДНК расщепляется большинством ферментов рестрикции.

Методика 13

Удаление бромистого этидия из ДНК, находящейся в растворе CsCl

Экстракция изопропанолом или бутанолом

1. Добавьте 1 объем ДНК в растворе CsCl, плотность которого равна плавучей плотности ДНК, и бромистый этидий в пробирку, вмещающую по меньшей мере 10 таких объемов. Пробирку нужно взять такую, чтобы ее можно было герметически закупорить и центрифугировать (можно использовать полипропиленовые или стеклянные пробирки, но ни в коем случае не пробирки из поликарбоната).
2. Добавьте 1 объем изопропанола или бутанола, насыщенного водным раствором, содержащим 5 М NaCl, 10 мМ трис и 1 мМ Na_3-ЭДТА (pH 8,5).
3. Герметично закройте пробирку и перемешайте содержимое. Это нужно проделывать в перчатках.
4. Повторяйте экстракцию до тех пор, пока полностью не исчезнет видимая окраска. После этого экстрагируйте еще один раз. Чем выше концентрация ДНК, тем больше требуется проводить экстракций.
5. Добавьте 2 объема H_2O.
6. Добавьте 6 объемов этанола и оставьте при —20°С на время от 1 ч до нескольких дней.
7. Отцентрифугируйте осадок.
8. Промойте осадок 70%-ным этанолом.
9. Слейте надосадочную жидкость и высушите осадок.
10. Растворите осадок в 100 мкл 10 мМ трис и 1 мМ Na_3-ЭДТА (pH 7,5).

Обсуждение

1. Бромистый этидий является мутагеном (30 мкг бромистого этидия обладают таким же мутагенным действием, как дым

от одной сигареты). Пользуйтесь пробиркой, из которой не вытекают жидкости с низким поверхностным натяжением.
2. Насыщение спирта раствором с высокой концентрацией соли улучшает разделение фаз и приводит к тому, что вода не утягивается из водной фазы.
3. (Этапы 3 и 4); разделение бромистого этидия между такими двумя фазами происходит быстро, и для этого не нужно интенсивного встряхивания.
4. (Этап 5); воду добавляют для того, чтобы при добавлении этанола CsCl не выпадал в осадок.
5. (Этап 6); в присутствии этанола большие количества ДНК (50 мкг) легко выпадают в осадок, и при этом не требуется сильного охлаждения. Однако, так как ДНК очень чистая, длительное осаждение не приводит к загрязнению препарата.

Методика 14

Образование гибридных фагов λgt

I. Расщепление ДНК

1. Расщепите по отдельности ДНК вектора и встраиваемую ДНК. Если использовать примерно по 5 мкг каждой из этих ДНК, то при трансфекции должно получиться около $5 \cdot 10^4$ гибридов.
   ДНК в буфере: ДНК 50 мкг/мл или больше,
   буфер для рестрикции с низким, средним или высоким содержанием соли (см. приложение 7), 10^{-4} М Na_2-ЭДТА.
2. Добавьте $^1/_{10}$ объема 0,1 М $MgSO_4$, чтобы получить 0,01 М $MgSO_4$.
3. Добавьте эндонуклеазу и инкубируйте в течение 10 мин при 37°С. Проведя электрофорез в геле, определите то количество фермента, которое дает полное расщепление.
4. Повторите этап 3.
5. Прогрейте в течение 3 мин при 70°С, чтобы инактивировать эндонуклеазу (см. приложение 7).
6. Если будете использовать эту ДНК для упаковки in vitro, то инкубируйте в течение 15 мин при 50°С. Если же будете использовать ее в трансфекции, то быстро охладите до 0°С.

II. Ковалентное соединение с помощью ДНК-лигазы фага Т4

1. Смешайте равные по весу количества ДНК вектора и встраиваемой ДНК.
2. Добавьте АТР до конечной концентрации 1 мМ.
3. Добавьте ДТТ до конечной концентрации 10 мМ.
4. На 1 мкг ДНК добавьте 0,1 ед. ДНК-лигазы фага Т4 или 0,1 мкл раствора лигазы 1 мг/мл.
5. Инкубируйте в течение 1—6 ч при 0—10°С.
6. Под электронным микроскопом или с помощью электрофореза в геле проверьте, произошло ли ковалентное соединение.
7. Проведите заражение этой ДНК или упакуйте ее.

Литература

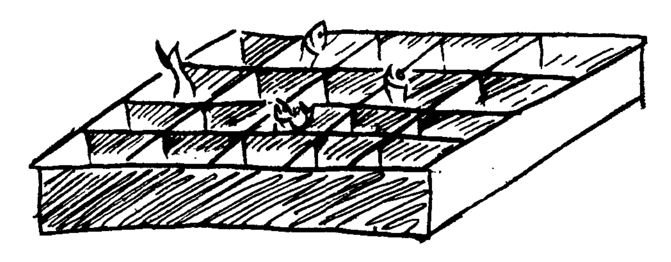
Thomas M., Cameron J. R., Davis R. W., 1974. Viable molecular hybrids of bacteriophage lambda and eukaryotic DNA, Proc. Natl. Acad. Sci., 71, 4579.

Обсуждение

ДНК вектора и встраиваемую ДНК расщепляют по отдельности, так как важно добиться такого расщепления векторной ДНК, чтобы нерасщепленной осталось около одной молекулы ДНК фага λ на 10^4 расщепленных молекул. Легко получить препарат ДНК фага λ, не загрязненный ингибиторами эндонуклеаз. В то же время многие препараты клеточной ДНК содержат такие ингибиторы. Если проводить совместное расщепление клеточной и фаговой ДНК, то присутствие ингибитора в препарате клеточной ДНК приведет к тому, что вероятность нерасщепленной ДНК фага λ окажется выше, чем 10^{-4}. Чтобы получить заведомо полное расщепление, нужно брать эндонуклеазы больше, чем это было определено на этапе 3. Этот этап имеет существенное значение только для векторной ДНК фага λ. Присутствие 10^{-4} нерасщепленной ДНК фага λ нельзя обнаружить по результату электрофореза в геле, но легко выявить по инфекционности. Для более высокой эффективности упаковки in vitro липкие концы ДНК фага λ должны быть соединены, а для более эффективной трансфекции они должны оставаться свободными. Энергия активации соединения липких концов ДНК фага λ высока, и потому для их эффективного соединения необходима высокая температура (50°С). При 0°С соединение липких концов ДНК фага λ происходит крайне медленно. Поэтому липкие концы, образующиеся под действием рестриктирующей эндонуклеазы, можно полностью соединить, не соединив в то же время липких концов ДНК фага λ (разд. II).

POISSON DISTRIBUTION





Основой флуктуационного теста Луриа—Дельбрюка служит знаменитое распределение Пуассона (Poisson distribution) независимо от того, имеют ли дело с мутантами бактерий или с мутантами рыб [Genetics, 28, 491—511 (1943)]. Рыб разглядеть легче, но разложить их по ячейкам сложнее, если, конечно, вы не птица.

Скорость соединения, катализируемого ДНК-лигазой фага Т4, прямо пропорциональна концентрации лигазы. Поэтому используют высокие концентрации этого фермента. При рекомендуемых концентрациях лигазы реакция завершается за несколько минут. Рекомендуемых 1—6 ч хватает с избытком, однако вреда этот избыток не причинит.

Методика 15

Упаковка ДНК фага λ в вирусные частицы in vitro

I. Упаковка

1. Возьмите 20 мкл индуцированных упаковывающих клеток, хранящихся при —70°С.

2. Перенесите в лед для оттаивания (не нагрейте!).
3. После оттаивания добавьте 2 мкл 50 мМ ATP.
4. Добавьте ≤1 мкг ДНК в объеме 1—10 мкл.
5. Осторожно перемешайте (клетки не должны лизировать).
6. Соберите жидкость на дно пробирки, проведя центрифугирование в микрофуге в течение 3 с.
7. Инкубируйте при 37°C в течение 30—60 мин.
8. Добавьте 0,2 мкл раствора ДНКазы I с концентрацией 1 мг/мл.
9. Если нужна максимальная эффективность упаковки, то добавьте еще 20 мкл оттаявшего экстракта и 2 мкл 50 мМ ATP (это увеличивает количество фага примерно в два раза). Инкубируйте при 37°C еще в течение 30—60 мин.
10. Добавьте 200 мкл буфера для разведения фага λ и храните так же, как препарат фага.
11. Высевайте не более 10—15 мкл такого препарата на чашку диаметром 9 см, используя для газона нерестриктирующий штамм RD104 (C600 *hsdR*⁻ *hsdM*⁺), *не содержащий supF*. Высев бо́льших количеств препарата приведет к гибели бактериального газона.

II. Получение индуцированных упаковывающих клеток

1. Штаммы бактерий
А: N 205 *recA*⁻ (*λimm* 434 *c*I-ts *b*2 *red* 3 *E*am 4 *S*am7)
Б: N 205 *recA*⁻ (*λimm* 434 *c*I-ts *b*2 *red*3 *D*am4 *S*am7)
2. Рассейте каждый из этих штаммов штрихом до отдельных колоний. Чашки инкубируйте при 25—30°C.
3. Проверьте рост нескольких колоний при 30 и 42°C.
4. С чашки, выращенной при 30°C, отберите уколом по одной такой колонии этих штаммов, которая не растет при 42°C.
5. Суспендируйте колонию каждого из этих штаммов в 200 мл бульона LB (30°C). Выращивайте клетки при 30°C до A_{600}=0,3.
6. Проведите индукцию обеих культур, инкубируя их в течение 15 мин при 42—43°C.
7. Инкубируйте 3 ч при 37°C.
8. Проверьте индукцию, отобрав из каждой культуры пробы по 1 мл. Добавьте в эти пробы по капле $CHCl_3$, инкубируйте в течение 5 мин при 37°C. Культура в пробе должна лизировать.
9. Слейте вместе обе эти культуры объемом по 200 мл. Осадите клетки, центрифугируя в течение 10 мин при 5000 об/мин.
10. Ресуспендируйте в 40 мл холодного буфера для разведения фага λ. Отцентрифугируйте 10 мин при 5000 об/мин.

11. Ресуспендируйте в 10 мл буфера для упаковки:
 0,04 М трис (pH 8),
 0,01 М $MgSO_4$,
 0,01 М спермидин-3HCl,
 0,01 М путресцин-2HCl,
 0,1% β-меркаптоэтанол
 7% ДМСО.
12. Центрифугируйте 5 мин при 5000 об/мин.
13. Ресуспендируйте осадок в 1 мл буфера для упаковки. Разлейте объемами по 20 мкл в полипропиленовые центрифужные пробирки на 0,5 мл.
14. Заморозьте в жидком азоте и храните при —70°C. Можно хранить несколько месяцев.

Литература

Hohn B., Murray K., 1977. Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 3259.
Sternberg N., Tiemeier D., Enquist L., 1977. In vitro packaging of a λ*D*am vector containing *Eco*RI DNA fragments of *E. coli* and phage P1, Gene, **1**, 255.

Методика 16

Трансфекция ДНК фага λ

I. Выращивание клеток

1. Отдельной колонией с чашки засейте 10 мл бульона LB в колбе на 125 мл. Инкубируйте в течение 20 ч при 37°C.
2. Разведите эту бактериальную культуру 1 : 100 в бульоне LB. На одну трансфекцию используйте 5 мл бульона (обычно засевают 50 мл бульона в колбе на 500 мл). Инкубируйте на качалке при 37°C, пока культура не достигнет плотности, при которой A_{600}=0,6—0,7. На это уходит обычно 2—3 ч. При A_{600}=0,3 добавьте тимидин до концентрации 50 мкг/мл.

II. Приготовление клеток

1. Осадите клетки, центрифугируя 5 мин при 5000 об/мин при 2°C.

2. Ресуспендируйте в половинном объеме среды СТ (50 мМ $CaCl_2$ и 50 мкг/мл тимидина). Все растворы, пробирки и пипетки должны находиться при 0°С (в ледяной бане).
3. Инкубируйте 5 мин при 0°С (в ледяной бане).
4. Осадите клетки, центрифугируя 5 мин при 5000 об/мин и 2°С.
5. Ресуспендируйте в $^1/_{20}$ исходного объема среды СТ при 0°С.

III. Заражение клеток ДНК

1. Добавьте 0,2 мл клеток к 0,1 мл ДНК (максимально 100 нг) в 0,1 М трис с рН 7,2 (0,09 М трис-HCl и 0,01 М трис-основание) и 50 мкг/мл тимидина при 0°С (в тонкостенной стеклянной пробирке при 0°С).
2. Инкубируйте в течение 3—60 мин при 0°С; 2 мин при 45°С. Высейте клетки в 2,5 мл мягкого агара LB на чашки, находящиеся при комнатной температуре.
3. Эффективность должна составлять около $2 \cdot 10^3$ бляшек на 1 нг ДНК фага λ, или примерно 1 бляшка на 10^4 молекул.

IV. Хранение клеток

1. Обработанные Ca^{2+} клетки можно заморозить в среде СТ с 7% диметилсульфоксида, погружая их в жидкий азот. Аликвоты по 1 мл хранят в жидком азоте.
2. Клетки размораживают при 0°С. После этого следуйте описанной выше методике, начиная с этапа III-1.
3. Клетки можно также ресуспендировать в 0,01 М $MgSO_4$, как на этапе II-2, и хранить около недели при 4°С. Эффективность трансфекции ДНК фага λ при этом обычно снижается в 2—10 раз.

Обсуждение

I. По-видимому, на эффективность трансфекции влияет история культуры. Поэтому всегда выращивайте сначала ночную культуру, а затем разводите ее в 100 раз и подращивайте. Не следует выращивать культуру до плотности, большей чем $A_{600} = 0{,}7$. Если культура переросла, то начните выращивать новую культуру, разведенную в 100 раз. Важное значение имеет хорошая аэрация, и поэтому выращивайте культуру в большой колбе. При использовании некоторых штаммов бактерий добавление тимидина повышает эффективность трансформации в два — четыре раза.

II. Для получения высокой эффективности трансформации важно строго выдерживать культуру на холоду (при 0°С). Клетки нельзя нагревать даже на короткое время.

III. При использовании более 100 нг ДНК на трансфекцию общее число бляшек, образующихся на чашке, может снизиться. Тонкостенной стеклянной (не пластиковой) пробиркой пользуются для того, чтобы получился более быстрый температурный шок. В случае фага λ, но не в случае плазмид очень важно, чтобы нагрев до 45°С происходил быстро. Ожидаемая эффективность составляет $2 \cdot 10^3$ бляшек на 1 нг, но это — максимальное значение.

IV. Если используются замороженные клетки, то эффективность трансфекции ДНК фага λ обычно снижается в 2—10 раз. С успехом могут использоваться клетки, хранившиеся замороженными в течение 9 мес.

Клетки

SF8 *(E. coli) hsdR⁻ hsdM⁻ recB recC lop*-11 (суперпродуцент лигазы) *supE*44 ($su2^+$) *gal*-96 Sm^R *leuB*6 *thi*-1 ($B1^-$) *thr*⁻

HB101 *(E. coli) hsdR⁻ hsdM⁻ recA*13 *supE*44 ($su2^+$) *lacZ*4 *leuB*6 *proA*2 *thi*-1 ($B1^-$) Sm^R

BNN45 *(E. coli) hsdR⁻ hsdM⁺ rec⁺ supE*44 ($su2^+$) *supF* ($su3^+$) $B1^-$ *met*⁻

Литература

Mandel M., Higa A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, J. Mol. Biol., 53, 159.

Методика 17

Субклонирование фрагментов ДНК в векторах-плазмидах *E. coli*

1. В пробирке на 1,5 мл от микрофуги проведите полное расщепление примерно 250 нг плазмидной ДНК (например, ДНК pBR322) соответствующей эндонуклеазой (эндонуклеазами).
2. Добавьте 0,1 мкл или менее раствора щелочной фосфатазы из кишечника теленка с концентрацией 1 мг/мл.
3. Инкубируйте в течение 15 мин при 37°С.
4. Добавьте равный объем перегнанного фенола, перемешайте в смесителе Vortex. После этого отцентрифугируйте.

5. Отберите верхнюю водную фазу полипропиленовым наконечником пипетки и перенесите ее в новую пробирку на 1,5 мл от микрофуги.
6. Добавьте около 0,1 мл насыщенного буфером эфира, перемешайте в смесителе Vortex. Отцентрифугируйте и отбросьте верхнюю фазу (эфир).
7. Еще два раза повторите экстракцию эфиром.
8. Продуйте, чтобы удалить эфир.
9. ДНК, которую нужно клонировать, расщепите соответствующей эндонуклеазой (эндонуклеазами). (Используйте такие количества ДНК, чтобы фрагмента, который хотите встроить, оказалось около 50 нг.)
10. Фрагмент ДНК, который нужно субклонировать, можно выделить с помощью электрофореза в агарозном геле (необязательно; см. методику 25).
11. Смешайте эквимолярные количества ДНК вектора и встраиваемой ДНК.
12. Добавьте АТР до конечной концентрации 1 мМ.
13. Добавьте ДТТ до конечной концентрации 10 мМ.
14. Добавьте 0,1 ед. лигазы фага Т4, или 0,1 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл.
15. Инкубируйте от 30 мин до 3 сут при 0—10°С.
16. Проведите трансфекцию клеток RD102=HB101/λ.
17. 50 нг обработанной фосфатазой и лигазой ДНК одного лишь вектора обычно приводят к образованию 0—10 колоний.

Литература

St. John T. (личное сообщение).

Методика 18

Трансформация плазмидной ДНК

1. Разведите выращенную в бульоне LB ночную культуру штамма HB101, RD102=HB101/λ или BNN45 в 100 раз в свежем бульоне LB (40 мл в колбе на 250 мл) при 37°С. Этого количества культуры достаточно для проведения 20 трансформаций.

2. Когда плотность культуры достигнет A_{600}=0,6 (через 2—3 ч), осадите клетки центрифугированием в течение 5 мин при 5000 об/мин и 2°С.
3. Ресуспендируйте в 20 мл 50 мМ $CaCl_2$ при 0°С и инкубируйте при 0°С в течение 5—60 мин.
4. Осадите клетки центрифугированием в течение 2 мин при 5000 об/мин и 2°С. Ресуспендируйте в 2 мл 50 мМ $CaCl_2$ при 0°С и инкубируйте при 0°С в течение 5—60 мин.
5. Добавьте 0,1 мл клеток к ДНК в 0,1 М трис при pH 7,2 (0,09 М трис-HCl, 0,01 М трис-основание) и 0°С. Инкубируйте при 0°С в течение 10 мин.
6. Тепловая обработка: *инкубируйте 2 мин при 37°С.* Инкубация в течение 10 мин при комнатной температуре, 2 мин при 37°С и 10 мин при комнатной температуре, 2 мин при 45°С и 10 мин при комнатной температуре или 2 мин при 45°С приводит к *одинаковому* эффекту (в отличие от того, что наблюдается в случае ДНК фага λ).
7. Добавьте 1 мл бульона LB и инкубируйте в течение 20 мин при 37°С.
8. Смешайте с 2,5 мл мягкого агара LB (без антибиотиков) при 47°С и вылейте на чашку LB, содержащую тетрациклин (10 мкг/мл) или ампициллин (50 мкг/мл, свежий раствор). Перед использованием чашки с тетрациклином можно хранить при 10°С в течение нескольких недель. Чашки с ампициллином можно хранить при 10°С перед их использованием в течение нескольких дней.

При использовании клеток НВ101 или BNN45 эффективность составляет около $4 \cdot 10^2$ трансформантов на 1 нг ДНК формы I плазмиды pBR322 (при использовании 5 нг ДНК на чашку).

Как для клеток НВ101, так и для клеток BNN45 насыщение при таких условиях достигается при использовании от 50 до 100 нг ДНК на чашку.

Полученные под действием *Eco*RI линейные молекулы ДНК pBR322 являются, по-видимому, неинфекционными для клеток НВ101 (фон в 0,3—0,5% может быть обусловлен присутствием нерасщепленных молекул). Однако они инфекционны для клеток SF8 и дают на них трансформантов в количестве 2—3% от того, что получается при использовании кольцевой замкнутой ДНК.

Литература

Mandel M., Higa A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, J. Mol. Biol., 53, 159.

Методика 19

Способность гибридного фага к комплементации в клетках *E. coli*

I. Литический отбор из пула гибридов

1. Вырастите ауксотрофы до поздней экспоненциальной фазы в среде М9+0,2% мальтозы+необходимые пищевые добавки (40 мкг/мл каждой из необходимых аминокислот). Определите концентрацию клеток.
2. Осадите клетки центрифугированием (8000 об/мин, 5 мин). Ресуспендируйте в 1/10 объема 10 м*M* $MgSO_4$ или в таком объеме, чтобы получилось 10^{10} клетка/мл.
3. Адсорбируйте $2 \cdot 10^6$ частиц фага (или менее) на $2 \cdot 10^9$ клеток в течение 15 мин при 37°С. Эффективность высева комплементирующего фага равна примерно 1.
4. Смешайте с 2,5 мл мягкого (~0,6%-ного) агара М9 и высейте на чашку. При 37°С для образования бляшек комплементирующего фага может потребоваться 6—40 ч.
5. Проведите очистку бляшек на неселективной чашке (чашке LB) и повторно проверьте комплементацию.

Обсуждение

1. При высоких концентрациях клеток часто подрастает газон, достаточный для выявления бляшек. Можно добавить на чашку 10 мкг бромистого этидия и выявлять бляшки, освещая чашку длинноволновым УФ-светом. При таких высоких плотностях клеток рост фага все еще зависит от способности фага комплементировать дефект бактерии-хозяина.
2. На чашку можно высевать до 10^7 фаговых частиц, и это не препятствует выявлению случаев комплементации, которые возникают с низкой частотой. Эффективность высева равна 1.
3. При необходимости можно, пользуясь стерильными миллипоровыми фильтрами, сделать чашки-реплики. Бляшкам, способным к комплементации, будут соответствовать большие зоны лизиса на газоне *E. coli* дикого типа после кратковременной инкубации таких чашек при 37°С.
4. Некомплементирующий фаг часто способен вырасти при длительной инкубации и на бактериальных мутантах с неполным блоком. Тем не менее иногда комплементирующие вирусы можно отличить по тому, что образуются бляшки большего размера, или по тому, что они появляются раньше.

5. Остерегайтесь размножения фага, обусловленного присутствием ревертантов.
6. Комплементация может зависеть, а может и не зависеть от ориентации гена. Гибридные фаги λ, содержащие дрожжевую ДНК, комплементируют *hisB*-мутанты *E. coli,* если последовательность *his*-3 дрожжевой ДНК ориентирована таким образом, что может считываться с промотора P_L. Однако клетки *RD105* (*E. coli trpC*9830) могут комплементироваться дрожжевой последовательностью независимо от ее ориентации. Более того, комплеменгация *trpC* может происходить и вообще в отсутствие P_L. Различия, наблюдаемые в том, как комплементация зависит от ориентации гена, могут быть обусловлены как силой отбора (для литического развития фага λ необходим лишь очень незначительный синтез триптофана), так и эффективностью экспрессии последовательности эукариотической ДНК.

Литература

Stinchcomb D. (личное сообщение).

II. Отбор из пула гибридов по двойным лизогенам

А. *Отбор*

1. Приготовьте препарат с высоким титром пула гибридного фага на чашках, а также препарат фага — помощника интеграции (λgt4-*lac*5). Препараты получайте на клетках, которые не могут расти на селективной минимальной среде (BNN45).
2. Вырастите до поздней экспоненциальной фазы культуру ауксотрофа в 50 мл *M*9+0,2% мальтозы+необходимые пищевые добавки (по 40 мкг/мл каждой из необходимых аминокислот). Определите плотность культуры.
3. Осадите клетки центрифугированием (8000 об/мин, 5 мин). Ресуспендируйте в $^1/_{10}$ объема 10 м*M* $MgSO_4$ или в таком объеме, чтобы получилось 10^{10} клетка/мл.
4. Смешайте $5 \cdot 10^8$ клеток с $2 \cdot 10^9$ частиц фага-помощника и 10^8 частиц гибридного фага.
5. Инкубируйте 15 мин при комнатной температуре.
6. Смешайте с 2,5 мл мягкого минимального агара *M*9 и вылейте на минимальную чашку без питательного вещества, по которому ведется отбор.
7. Выращивайте при 32°С, так как фаг — помощник интеграции несет температурочувствительную мутацию *c*I857 по респрессору. (Это занимает 1—3 дня.)

8. Контрольные чашки: 1) клетки без фага, 2) фаг без клеток, 3) меньше фага из пула гибридов (10^7 или 10^6 фаговых частиц).
9. Уколом отберите каждую выросшую колонию и суспендируйте ее в 0,1—1,0 мл бульона LB.
10. Инкубируйте при 32°C до тех пор, пока культура не помутнеет (до плотности 10^7—10^8 клетка/мл). После этого в течение по крайней мере 20 мин инкубируйте при 42°C. Продолжайте инкубировать при 37°C в течение 2 ч. Для полного лизиса добавьте каплю $CHCl_3$.
11. Штрихом рассейте получившийся лизат до отдельных бляшек на чашке LB с газоном BNN45. В мягкий агар добавьте 40 мкл раствора Xgal с концентрацией 40 мг/мл, чтобы выявить фаг — помощник интеграции λgt4-*lac*5 (образует голубые бляшки).
12. Из бесцветных бляшек приготовьте на чашках препараты фага с высоким титром.
13. Повторно проверьте комплементацию, начиная с этапа 4.

Б. *Материалы*

1. Гибридный фаг: любой фаг *att*⁻.
   Фаг-помощник: любой фаг *att*⁺*int*⁺ с функциональной гомологической иммунностью, например фаг λgt4-*lac*5.
2. Клетка: любой ауксотроф, на котором фаг λ будет образовывать бляшки и который может расти на минимальных средах с пищевыми добавками.
3. Чашки: M9.

Обсуждение

Большинство используемых для клонирования векторов λ не содержит функционально активного сайта прикрепления (*att*⁺) или функционально активного гена интеграции (*int*⁺). Поэтому они не могут образовывать стабильных лизогенных бактерий. Можно, однако, использовать фаг-помощник, способный к интеграции. После его интеграции гибридный фаг λ может встроиться уже в результате рекомбинации с гомологичными ему последовательностями. Такие двойные лизогены образуются с частотой около 1%. Излечивание от них происходит довольно легко, но их можно поддерживать с помощью селекции.

1. В качестве помощника предлагается λgt4-*lac*5. Этот фаг несет мутантный ген репрессора λ*c*I857 и содержит ген β-галактозидазы *E. coli* (*lacZ*). При получении препарата фага на чашках используют такие клетки-хозяева, которые не могут расти на минимальных средах. Это делается для того, чтобы исключить возможность загрязнения препаратов фага клетками, способными расти на селективных чашках.

2. Клетки выращивают на минимальной среде, чтобы они к ней адаптировались. Мальтозу добавляют для лучшей адсорбции фага λ.
3. Если перед центрифугированием плотность культуры была значительно ниже, чем 10^9 клетка/мл, то клетки можно ресуспендировать в меньшем объеме, но так, чтобы получилась плотность около 10^{10} клетка/мл.
4. При таком соотношении клеток и фага большинство клеток будет заражено несколькими фагами-помощниками, но небольшая часть клеток будет заражена более чем одним гибридным фагом. Заметьте, что на чашки высевают по многу клеток. Если частота реверсий используемой мутации составляет 10^{-7}, то из колоний, выросших на минимальных чашках, несколько колоний окажется ревертантами. Эти ревертанты, наверное, содержат интегрированный фаг-помощник и могут содержать какой-то случайный гибрид фага λ. Поэтому важно проводить повторный тест на комплементацию.
5. Инкубирование клеток и фага в высоких концентрациях обеспечивает хорошую адсорбцию.
6. Мягкий агар приготавливается на воде. Его можно расплавить непосредственно перед использованием, а минимальные среды добавить после того, как он охладится до 50°С.
7. Большинство фагов — помощников интеграции несет температурочувствительную мутацию по репрессору *c*I857. Поэтому температуру никогда нельзя поднимать выше 37°С. Использование мутации *c*I857 помогает выделять гибрид на этапе 10.
8. Контрольные чашки необходимы, поскольку они позволяют быстро оценить возможность комплементации. Высевая клетки без фага, определяют количество ревертантов в препарате клеток. В разных препаратах может содержаться разное количество ревертантов. Высевая фаг без клеток, определяют содержание в препарате фага клеток, способных расти на минимальных чашках. Высев различных количеств гибридного фага позволяет быстро выявить наличие комплементации, так как число истинных комплементаций должно быть пропорционально количеству гибридного фага. Обычно пул гибридов из *Salmonella* дает около 10 комплементирующих колоний на чашку.
9. (Этапы 9 и 10); при инкубации суспензии клеток при 42°С происходит индукция лизогенных бактерий (если они несут мутацию *c*I857). Через 20 мин инкубации индукция становится необратимой.
10. (Этапы 11 и 12); фаг — помощник интеграции несет область *lac* и на чашках с Xgal образует голубые бляшки. Бесцветные бляшки образуют гибридные фаги, которые могли отвечать за рост клеток.

11. (Этап 13); повторить комплементацию необходимо для того, чтобы подтвердить обнаруженный эффект.

Литература

Struhl K., Cameron J. R., Davis R. W., 1976. Functional genetic expression of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., **73**, 1471.

Методика 20

Электрофорез в агарозном геле

I. Агарозный гель

Электрофорез в агарозном геле проводят в горизонтальном направлении, так как при этом 1) гель с низкой концентрацией агарозы лучше держится, 2) получается меньшее перекашивание (коллапс) в процессе электрофореза и 3) меньше искажаются полосы ДНК. По-видимому, проще всего работать с системой, когда гель полностью покрыт слоем буфера для электрофореза толщиной около 1 мм. Сопротивление агарозы ненамного превышает сопротивление буфера, так что значительная часть тока течет через агарозу.

А. *Буферы*

Во все буферы с нейтральными значениями pH можно добавлять 0,5 мкг/мл бромистого этидия.

1. *Трис-боратный буфер*	*10× (на 1 л)*
89 мМ трис-основание	108 г
89 мМ борная кислота	55 г
2,5 мМ Na_2-ЭДТА	9,3 г
pH 8,3	
2. *Трис-фосфатный буфер*	*10× (на 1 л)*
89 мМ трис-основание	108 г
23 мМ H_3PO_4	15,5 мл 85%-ного раствора H_3PO_4 (1,679 г/мл)
2,5 мМ Na_2-ЭДТА	9,3 г
pH 8,3	
3. *Трис-ацетатный буфер*	*50× (на 1 л)*
40 мМ трис-основание	242 г
20 мМ уксусная кислота	57,1 мл ледяной уксусной кислоты
2 мМ Na_2ЭДТА	37,2 г
pH 8,1	

4. *Щелочной буфер*	*100× (на 1 л)*
30 мМ NaOH	166 мл 50%-ного NaOH
2 мМ Na_2-ЭДТА	74,5 г

В процессе электрофореза буфер у анода защелачивается, а у катода закисляется. Поэтому обычно пользуются буферной системой с высокой емкостью. Буферы не содержат ионов Cl^-, так как последние не обладают буферной емкостью, и их присутствие может привести к тому, что ДНК в геле утратит биологическую активность.

1. *Трис-боратный буфер.* Обладает высокой буферной емкостью. При его использовании, по-видимому, получаются наиболее узкие полосы. Основной раствор 10× не зарастает, но при длительном хранении в нем образуется осадок, который растворим в щелочи. В присутствии бората агарозные гели не растворяются при высокой концентрации $NaClO_4$ или KI.
2. *Трис-фосфатный буфер.* Тоже обладает высокой емкостью. При его использовании получаются примерно такие же результаты, что и при использовании трис-боратного буфера. Основной раствор, однако, может зарастать. Его преимущество заключается в том, что такие гели можно растворять в концентрированном растворе $NaClO_4$ или KI.
3. *Трис-ацетатный буфер.* Обладает относительно низкой буферной емкостью, и при длительном электрофорезе может возникнуть необходимость в рециркуляции буфера в аппарате. Использование при электрофорезе высоких напряжений не вызывает нагрева. Исходные растворы могут зарастать. Гели в трис-ацетатном буфере можно растворять в концентрированном $NaClO_4$ или KI. Этот буфер, по-видимому, используется наиболее широко.
4. *Щелочной буфер.* Обладает очень низкой емкостью. Обычно при его использовании необходима рециркуляция буфера в аппарате. Наносимые образцы не должны содержать Mg^{2+}, иначе ДНК выпадет в осадок. Ионы Mg^{2+} необходимо удалять, добавляя избыточные количества ЭДТА.

Б. *Агароза*

Препараты агарозы значительно различаются по твердости, по разрешающей способности при разделении фрагментов ДНК, электрофоретической подвижности ДНК, легкости плавления, прозрачности и наличию вредных примесей. Наиболее вредной примесью являются, по-видимому, сульфонированные агарозы, подавляющие активность многих ферментов, работающих на нуклеиновых кислотах.

Обычно мы пользуемся агарозой фирмы MC/B. Агарозу растворяют в буфере для электрофореза, нагревая до кипения в микроволновой печи. Необходимо убедиться, что рас-

твор стал гомогенным и что в нем не осталось твердых частиц агарозы. Перед тем как залить гель, раствор охлаждают до 50°С. Если заливать гель слишком горячей агарозой, то легко можно повредить аппарат для электрофореза

В. *Лунки для образцов*

Лунки для образцов делают с помощью погруженной в расплавленный гель гребенки из оргстекла, полихлорвинила или тефлона. Гребенку устанавливают до заливки геля таким образом, чтобы кончики зубьев находились примерно в 0,5 мм от основания геля. Если лунки достанут дна, то образец может протечь под гель. Когда гель полностью застынет, гребенку вынимают и лунки заполняют буфером для электрофореза.

Г. *Нанесение образцов и краски*

Наносимые образцы содержат 5—10% глицерола или 5—10% сахарозы и 0,025% красителя, благодаря которому можно проследить за ходом электрофореза. Например, можно добавить в образец $^1/_{10}$ объема раствора, содержащего 50% глицерола и 0,25% красителя.

ДНК. Наносите около 10 нг ДНК в расчете на каждую ожидаемую полосу. Гель будет перегружен, если в полосе окажется более чем примерно 100 нг ДНК.

Краска

Бромфеноловый синий (распадается в щелочи).

Бромкрезоловый зеленый (обладает одинаковой подвижностью и в нейтральных, и в щелочных растворах).

Ксиленцианол FF (распадается в щелочи; подвижность ниже, чем подвижность бромфенолового или бромкрезолового).

Образцы можно наносить, используя автоматическую пипетку и полипропиленовый наконечник или с помощью микрошприца, на который надет тонкий пластиковый шланг.

Подвижность небольших молекул ДНК может быть такой же или даже большей, чем подвижность используемого красителя. Чем ниже концентрация агарозы и (или) выше напряженность, тем больший фрагмент ДНК будет обладать такой же подвижностью, как и краситель. Краситель поглощает флуоресценцию связанного с ДНК бромистого этидия. Это приводит к тому, что в том месте геля, где находится краска, невозможно наблюдать слабые полосы ДНК.

Образцы можно наносить и без краски.

Д. *Напряженность*

Обычно используют напряженность от 0,5 до 5 В/см. При небольшой напряженности получается более высокое разре-

шение, особенно для высокомолекулярных ДНК (>70 kb). При электрофорезе небольших молекул ДНК (<2kb), чтобы увеличить их подвижность и тем самым снизить диффузность полос, используют бо́льшую напряженность. Чаще всего электрофорез проводят в 0,7%-ной агарозе при 1 В/см в трис-ацетатном буфере в течение примерно 12 ч.

Подвижность ДНК почти в точности обратно пропорциональна логарифму длины молекулы.

Длина дуплекса	Концентрация агарозы, %	Градиент напряжения, В/см
150—1000	1,8	2—3
300—2500	1,4	2—3
500—4000	1,0	1—2
700—6000	0,7	0,5—1
1000—9000	0,5	0,5—1

При электрофорезе в трис-ацетатном буфере с напряженностью 1 В/см краска движется со скоростью около 1 см/ч.

Литература

McDonell M. W., Simon M. N., Studier F. W., 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels, J. Mol. Biol., **110**, 119.

Peacock A. C., Dingman C. W., 1968. Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels, Biochemistry, **7**, 668.

II. Окрашивание ДНК в агарозных гелях

Предостережение. Бромистый этидий, продукты его метаболизма и акридиновый оранжевый являются мутагенами. В тесте Эймса 90 мкг бромистого этидия или 80 мкг акридинового оранжевого приводят к такому же результату, как конденсат дыма от одной сигареты или 2 мкг нитрозогуанидина. Поэтому при работе с их растворами надевайте перчатки.

А. *Бромистый этидий*

Бромистый этидий является интеркалирующим агентом и связывается с двухцепочечной нуклеиновой кислотой. Ультрафиолетовый свет, поглощенный бромистым этидием (300 нм) или ДНК (260 нм), но затем переданный бромистому этидию, испускается в виде флуоресценции при 590 нм. Наилучшее окрашивание получается, если перед проведением электрофореза нуклеиновых кислот в гель и в электрофорезный буфер внести бромистый этидий в концентрации примерно 0,5 мкг/мл. Гель можно окрасить и после окончания

электрофореза, вымочив его в буфере с 0,5 мкг/мл бромистого этидия в течение примерно 1 ч. В обоих случаях не обязательно проводить отмывку геля от красителя. Можно прокрасить и одноцепочечную нуклеиновую кислоту. Для этого нужно погрузить гель на 1 ч в 1 мМ $MgSO_4$ с 5 мкг/мл бромистого этидия, а затем отмыть краситель в 1 мМ $MgSO_4$ в течение 1 ч.

Имеющийся в продаже бромистый этидий содержит много примесей (на долю самого бромистого этидия приходится лишь около половины веса препарата). Его концентрацию можно опредилить спектрофотометрически.

$A_{480}=5700\ M^{-1}см^{-1}$, а молекулярная масса=394 г/моль.

Б. *Акридиновый оранжевый*

Акридиновый оранжевый может интеркалировать (встраиваться) в двухцепочечную нуклеиновую кислоту, а может также и связываться с одно- и двухцепочечной нуклеиновой кислотой, взаимодействуя электростатически с ее фосфатными группами. Поглощаемый ультрафиолетовый свет с длиной волны 260 нм может испускаться в виде флуоресценции. При этом двухцепочечная нуклеиновая кислота флуоресцирует при 530 нм (зеленый свет), а одноцепочечная — при 640 нм (красный свет).

Гели окрашивают, выдерживая их в течение 1 ч в растворе 30 мкг/мл акридинового оранжевого в 10 мМ растворе соли. Отмывают в течение 1 ч в 0,1 мМ растворе соли.

III. Фотографирование гелей, содержащих нуклеиновые кислоты

Многие красители, связывающиеся с нуклеиновыми кислотами, флуоресцируют при облучении УФ-светом. Такие красители, как бромистый этидий, обладают плоской группой, которая может свободно вращаться, если краситель находится в растворе. Если же краситель связан с ДНК, то вращение этой группы оказывается заторможенным. В результате этого флуоресценция таких красителей в связанном с нуклеиновой кислотой состоянии оказывается гораздо выше, чем в растворе с низкой вязкостью. Нуклеиновая кислота может поглощать ультрафиолетовый свет; эта энергия передастся на краситель, а затем высветится в виде флуоресценции.

Максимальная чувствительность при фотографировании получается обычно при облучении светом с длиной волны около 260 нм. Однако при таком облучении быстро нарушается функциональная активность нуклеиновой кислоты (каждая секунда облучения ДНК фага λ снижает ее инфекционность на порядок).

Облучение же в течение нескольких минут светом с длиной волны 365 нм не вызывает заметного снижения инфекционности нативной ДНК фага λ (как с бромистым этидием, так и без него), но приводит к образованию некоторого количества поперечных сшивок.

А. *Источник УФ-света*

1. Источник с длиной волны 254 нм (TS36, UV Products).
2. Источник с длиной волны 300 нм (TM36, UV Products).
3. Источник с длиной волны 365 нм (TL33, UV Products).

Б. *Фильтры*

1. Для УФ (контрастный фильтр J-344, UV Products).
2. Для флуоресценции бромистого этидия при 590 нм — желатиновый фильтр 23A, Kodak Wratten.
3. Для флуоресценции акридинового оранжевого при 530 нм и при 640 нм — желатиновый фильтр 12 для флуоресценции в зеленой (от двухцепочечной) и красной (от одноцепочечной нуклеиновой кислоты) областях спектра или фильтр 40 только для зеленого, а фильтр 29 — только для красного света (Kodak Wratten).

В. *Фотоаппарат* (Polaroid MP-4)

Г. *Пленка* (Polaroid 667 или 665)

Поскольку большинство фильтров флуоресцируют при УФ-облучении, то контрастный УФ-фильтр всегда помещают между источником УФ-света и цветными фильтрами. При длительном облучении прозрачность для ультрафиолета фильтра в источнике C61 снижается. Время полужизни такого фильтра составляет примерно 20 ч. При длительном облучении, по-видимому, портятся также и контрастный УФ-фильтр, и желатиновые фильтры, так что их следует периодически заменять. При использовании источника C61 с новым фильтром интенсивность света с длиной волны 230—270 нм составляет 2400 мкВ/см², а без фильтра 8500 мкВ/см².

IV. Гели с глиоксалем

А. *Приготовление образца*

1. Если концентрация нуклеиновой кислоты в препарате достаточно высока, то можно использовать непосредственно такой препарат. В противном случае осадите нуклеиновую кислоту эталоном и ресуспендируйте в H_2O.
2. В пробирке от микрофуги составьте пробу объемом 50 мкл: 25 мкл ДМСО (если необходимо добавлять больший объем

препарата, то количество ДМСО можно уменьшить или вообще не добавлять его),
2,5 мкл 0,2 М $NaPO_4$ (рН 7,0),
7,1 мкл 7М деионизованного глиоксаля,
15,3 мкл препарата.
3. Закройте пробирку крышкой и инкубируйте в течение 60 мин при 50°С.
4. Добавьте сахарозу или глицерол, бромфеноловый синий в качестве красителя и нанесите образец на гель.

Б. *Гель*

1. В качестве буфера для электрофореза используется 10 мМ $NaPO_4$ (рН 7,0).
2. Используется гель из 1—1,5%-ной агарозы или 0,5%-ной агарозы и 1,5—2%-ного раствора полиакриламида.
3. Электрофорез проводится в течение 4—20 ч при 1 В/см.
4. Необходима рециркуляция буфера в аппарате.
5. а. Окрашивайте в растворе акридинового оранжевого с концентрацией 30 мкг/мл в течение 30 мин. Отмывайте, погрузив гель на 1 ч в 1 мМ Na_3-ЭДТА.

или

б. Чтобы глиоксилирование не блокировало гибридизации нуклеиновых кислот, проведите обратную реакцию. Для этого выдержите гель в течение 30 мин в 200 мл 50 мМ NaOH. Нейтрализуйте гель и окрасьте нуклеиновую кислоту, поместив гель на 30 мин в 200 мл 0,2 М ацетат натрия (рН 4,0) с бромистым этидием в концентрации 1 мкг/мл.

Отмойте гель, поместив его на 30 мин в 0,2 М ацетат натрия (рН 4,0).

6. Фотографирование.
а. Бромистый этидий: освещайте светом с длиной волны 254 нм и фотографируйте, используя УФ-фильтр и оранжевый фильтр.
б. Акридиновый оранжевый: освещайте светом с длиной волны 254 нм и фотографируйте, используя УФ-фильтр и желтый фильтр.

Двухцепочечная нуклеиновая кислота — флуоресценция в зеленой области спектра при 530 нм.

Одноцепочечная нуклеиновая кислота — флуоресценция в красной области спектра при 640 нм.

В. *Приготовление глиоксаля*

1. 30%-ный раствор глиоксаля (технического) в H_2O соответствует приблизительно 7 М. Глиоксаль легко окисляется, и

продукты его окисления можно удалить с помощью ионообменной хроматографии. Среди продуктов окисления гликолевая, глиоксиловая и муравьиная кислоты.

2. Деионизируйте, пропуская через колонку (сделанную из пипетки на 10 мл) с AG-501-X8 или AG-501-X8(0). На 1 мл глиоксаля нужно 0,5 мл смолы.
3. Храните в герметично закупоренных пробирках при —20°C. (Пробирки должны быть плотно закупорены, а воздушная прослойка — небольшой.)

Г. *Стабильность глиоксаля*

pH<6 — стабилен
pH 7 — стабилен в течение по крайней мере 20 ч
Константы скорости разложения: pH 8,0—0,001 $мин^{-1}$
pH 10—0,02 $мин^{-1}$
pH 11—0,06 $мин^{-1}$

Литература

McMaster G. K., Carmichael G. G., 1977. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 4835.
St. John T. (личное сообщение).

Методика 21

Перенос ДНК на нитроцеллюлозу или диазотированную бумагу

I. Перенос из агарозных гелей

A. *Агарозный гель*

1. Проведите электрофоретическое разделение ДНК, используя горизонтальный аппарат и гель размера 14,5×13,5×0,8 см (150 мл). Обычно мы используем 0,7%-ную агарозу и трис-ацетатный буфер.
2. В каждую лунку длиной 0,4 см можно нанести до 5 мкг ДНК, расщепленной рестриктирующей эндонуклеазой. Мы наносим около 1 мкг расщепленной бактериальной ДНК.

3. В буфер для электрофореза добавлен бромистый этидий (0,5 мкг/мл). При фотографировании гель освещают коротковолновым УФ-светом.

Б. *Расщепление больших молекул ДНК в геле посредством депуринизации*

Если используемая ДНК получена с помощью метода быстрого выделения, то депуринизацию проводить не нужно. По-видимому, при действии диэтилоксидиформата и прогрева в ней образовалось столько одноцепочечных разрывов, что стал возможным быстрый и полный ее перенос из геля. В этом случае можно опустить этапы 1—3 и начать прямо с этапа В-1.

1. Поместите гель [размером 14,5×13,5×0,8 см (150 мл)] в лоток и добавьте 250 мл 0,25 М HCl при комнатной температуре.
2. Периодически покачивайте в течение 15 мин. После этого слейте кислоту и повторите этапы 1 и 2.
3. Быстро сполосните гель водой и сразу же переходите к этапу В.

В. *Денатурация щелочью*

1. Добавьте 250 мл 0,5 М NaOH и 1,5 М NaCl, осторожно покачивайте в течение 15 мин.
2. Слейте щелочь и повторите этап В-1.

Г. *Нейтрализация*

1. Для переноса ДНК на нитроцеллюлозу нейтрализуйте, добавив 500 мл раствора, содержащего 0,5 М трис-HCl (pH 7,5) (60 г трис-основания и 30 мл концентрированной HCl на 1 л) и 1,5 М NaCl (90 г на 1 л) при комнатной температуре. Осторожно покачивайте в течение 30 мин.
2. Для переноса на диазотированную бумагу нейтрализуйте *двумя* порциями по 250 мл 1 М ацетата натрия (pH 4,0). В каждой порции выдерживайте по 30 мин. Удалите высокую концентрацию соли, промыв гель в течение 30—60 мин в 0,1 М ацетате натрия (pH 4,0).

Д. *Перенос на бумагу*

1. На большой лист пластика или на лоток положите стопку из 12 листов бумаги ватман 3ММ (листы размером 57×46 см нарежьте или сложите и разорвите на четыре части). Намочите их буфером. Смачивайте и накладывайте сразу по два листа. Пузырьки воздуха удаляйте, прокатывая стеклянную палочку или пипетку. Буфер: для переноса на нитроцеллюлозу используйте буфер SSPE

20× (см. методику 23), для переноса на диазотированную бумагу — 0,1 М ацетат натрия (рН 4,0).
2. На бумагу 3ММ наложите гель.
3. Смочите водой лист нитроцеллюлозного фильтра (Schleicher and Schuell B85 или HAWP Millipore) или лист диазотированного фильтра, вырезанный по размерам геля. Наложите его на гель так, чтобы между фильтром и гелем не оказалось пузырьков воздуха.
4. На нитроцеллюлозный фильтр наложите пять смоченных водой листов бумаги 3ММ (вырезанных по размерам фильтра). Укладывайте их так, чтобы между листами не было воздушных пузырьков.
5. Сверху бумаги 3ММ уложите стопку бумажных полотенец, нарезанных по тому же размеру. Толщина стопки должна составлять около 6 см. Сверху положите тонкую пластинку плексигласа, на которую поместите груз весом в 1 кг.
6. Проводите перенос в течение не менее 2 ч.
7. Переверните фильтр вместе с усохшим гелем, и мягким карандашом отметьте на нем края геля и места лунок.
8. На 10 мин смочите нитроцеллюлозный фильтр буфером SSPE2× и затем высушите в вакуумной печи при 80°С в течение 2 ч.
9. Проводите гибридизацию, как описано в методике 23.

Литература

Loh E. Y. (личное сообщение).

Southern E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol., **98**, 503.

Wahl G. M., Stern M., Stark G. R., 1979. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl paper and rapid hybridization by using dextran sulfate, Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 3683.

II. Перенос из бляшек фага λ

1. Вырастите чашки LB с бляшками фага λ так, чтобы на чашке было 10^2—10^5 бляшек. Используйте сухие чашки или чашки, разлитые за 2 дня до опыта.
2. Чтобы агар стал твердым, охладите чашки с бляшками при 4°С. Держите их при этой температуре, от примерно 15 мин до нескольких часов.
3. На газон наложите сухой нитроцеллюлозный фильтр диаметром 82 мм (Schleicher and Schuell BA85 или HAWP Millipore). Следите, чтобы между агаром и фильтром не оказалось пузырьков воздуха.

4. Адсорбцию проводите в течение 1—20 мин.
5. а. Во время этой адсорбции сделайте отметки на фильтре и на чашке, чтобы фиксировать их взаимную ориентацию. Для этого можно проколоть каждый фильтр (в то время, когда он находится на чашке) по краю в трех местах шприцем с иглой номер 25 и нанести капли черных нерастворимых в воде чертежных чернил, в которые добавлена денатурированная немеченая ДНК-зонд в концентрации 1 мкг/мл. Объем наносимых капель составляет около 10 мкл. Чашки нужно помечать несимметрично и так, чтобы их можно было размечать.
   б. Чтобы фиксировать ориентацию фильтра относительно чашки, нужно добавить на чашку с бляшками такой фаг, который можно на чашке идентифицировать и который будет гибридизоваться с зондом. Перед тем как поставить чашку инкубироваться, капните на газон около 10 частиц фага λgt5-*lac*5, pBR322. Можно также добавить 10—20 частиц фага λgt5-*lac*5, pBR322 при высеве 10^2—10^5 частиц испытываемого фага. В этих случаях высев проводят в верхнем агаре с Xgal (добавляется 40 мкл раствора Xgal в ДМСО с концентрацией 40 мг/мл, который хранят при —20°С).
6. Осторожно снимите фильтр с чашки.
7. Погрузите фильтр (или сразу всю партию фильтров) в 0,5 *М* NaOH и 1,5 *М* NaCl на время от 20 с до 5 мин.
8. Фильтр (или сразу всю партию) погрузите в 0,5 *М* трис (pH 7,5) и 1,5 *М* NaCl на время от 20 с до 5 мин.
9. Сполосните в буфере SSPE2× (см. методику 23).
10. Промокните и отожгите в вакууме при 80°С в течение 1,5—2 ч.
11. Гибридизацию проводите, как указано в методике 23.
12. После того как проявите рентгеновскую пленку, наложите ее на обернутый в пластик фильтр. Перенесите на пленку те пометки, которые были сделаны на фильтре, чтобы фиксировать ориентацию и номер.
13. Наложите маркированную рентгеновскую пленку на исходную чашку. Выявите бляшки, дающие гибридизацию.

Обсуждение

В бляшке фага λ содержится значительное количество ДНК (как в частицах фага, так и в виде свободной ДНК). При контакте с нитроцеллюлозным фильтром часть этой ДНК необратимо адсорбируется на нем. После этого адсорбированную ДНК можно денатурировать и проводить с ней гибридизацию, не вызывая ее смещения. В результате удается локализовать те бляшки, в которых есть последовательность ДНК, гибридизующаяся

с радиоактивным зондом. С каждой чашки можно сделать по крайней мере семь таких отпечатков.

1. При использовании чашек LB пятна гибридизации получаются сильнее, чем при использовании чашек для фага λ, хотя бляшки на первых и оказываются мельче. Допустимое число бляшек на чашку зависит от размера бляшек. Если бляшки на чашке сливаются, то пятен гибридизации видно не будет. Поскольку размер бляшек обратно пропорционален количеству высеваемых для газона клеток, то при необходимости можно сделать бляшки нужной величины. Использование подсушенных чашек снижает вероятность захвата частиц верхнего агара на этапе 6.
2. Повышение твердости агара при охлаждении предотвращает захват частиц верхнего агара на этапе 6.
3. Можно пользоваться нестерильными фильтрами прямо из упаковки. Если под фильтром окажутся пузырьки воздуха, то они будут препятствовать переносу ДНК на фильтр. В этом месте ошибочно будет получен отрицательный результат.
4. Адсорбция происходит почти мгновенно. Поэтому после того, как фильтр коснулся чашки, не сдвигайте его.
5. Это одна из наиболее сложных операций. Рекомендуем пользоваться вторым методом (5, б). При расщеплении Xgal β-галактозидазой образуется соединение голубого цвета. Фаг, который несет область *lac*, образует в присутствии Xgal голубые бляшки. Такие бляшки остаются голубыми в течение по крайней мере нескольких дней. Так как Xgal не является индуктором, то большинство клеток газона окраски не дает. Фаг с областью *lac* индуцирует синтез β-галактозидазы потому, что репрессор этого оперона титруется большим числом копий оператора.
6. Будьте осторожны, чтобы не захватить верхний слой агара. Если это произойдет, то смойте агар на этапе 7.
7. (Этапы 7—10); это обычные процедуры, выполняемые при работе с нитроцеллюлозой. Точное выполнение этих операций не является критическим. Даже при опускании этапов 7—9 слабые сигналы гибридизации все еще будут наблюдаться. Не проводите отжига фильтров в течение более 2 ч и не нагревайте их выше 80°C. В противном случае фильтры станут еще более ломкими, чем обычно.
8. (Этапы 11 и 12); как правило, трудно сопоставить пятна почернения на пленке с определенными бляшками на чашке. Обычно из той области чашки, в которой произошла гибридизация, мы зубочисткой или платиновой проволочкой перекалываем несколько бляшек на газон чувствительных клеток. Если пять раз уколоть примерно в одно и то же место, то образуется большая бляшка. Перекалывайте бляшки по шаб-

лону. С чашки с переколотыми по шаблону бляшками снимите фильтр-реплику. После того как выявите бляшки нужных фагов, проведите их очистку и повторную проверку.

Литература

Benton W. D., Davis R. W., 1977. Screening of λgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ, Science, **196**, 180.

III. Перенос из бактериальных колоний

1. Вырастите колонии, посеянные по шаблону на селективную чашку.
2. Получите отпечаток на сухой нитроцеллюлозный фильтр (диаметром 82 мм; Schleicher and Schuell BA85 или HAWP Millipore) или на смоченную (бульоном) бумагу ватман 540. Пользуйтесь каким-либо из следующих способов:
   а. Положите фильтр прямо на колонии, пока они еще достаточно малы. После этого перенесите фильтр на свежую селективную чашку, поместив его таким образом, чтобы сторона с колониями была обращена не к среде, а к воздуху. Таким образом можно сделать только один отпечаток.
   б. С помощью бархата перепечатайте колонии на фильтр, положенный на новую селективную чашку. Таким способом можно сделать несколько отпечатков.
   в. Вырастите колонии в ячейках планшета для микротитрования. С помощью штампа перенесите их на фильтр. Таким способом можно получить много отпечатков, на которые нанесены одинаковые количества клеток.
3. Когда на фильтре вырастут колонии, фильтр осторожно снимите. Пометьте его ориентацию, пользуясь мягким карандашом или сделав на фильтре вырезы. Чтобы потом ориентировать рентгеновскую пленку и чтобы проверить способность гибридизоваться и эффективность мечения ДНК-зонда, нанесите на фильтр каплю с 10 нг денатурированной немеченной ДНК-зонда. Каждый фильтр должен быть маркирован по-своему и несимметрично.
4. Положите фильтр на два листа бумаги 3MM (14×23 см), намоченных в 30 мл 0,5 М NaOH и 1,5 М NaCl, на 3—10 мин. Фильтр нужно накладывать так, чтобы та сторона, на которой находятся колонии, была обращена вверх.
5. Чтобы удалить избыток жидкости, перенесите фильтр на лист сухой бумаги 3MM. Фильтр кладите так, чтобы сторона с колониями находилась сверху.
6. На 3—10 мин положите фильтр на два листа бумаги 3MM

(14×23 см), намоченных 30 мл 0,5 M трис (pH 7,5) и 1,5 M NaCl. Фильтр накладывайте так, чтобы сторона с колониями была обращена вверх.

7. Поместите фильтр (стороной с колониями вверх) на аппарат для отсасывания (воронку), включите насос. Дважды сполосните 25 мл 90%-ного этанола, отсасывайте досуха.
8. Промокните между листами фильтровальной бумаги. Отожгите с прижатой фильтровальной бумагой при 80°С в вакууме в течение 1,5—2 ч.
9. Гибридизацию проводите, как указано в методике 23.
10. Проявленную рентгеновскую пленку совместите с завернутым в пластик фильтром. Пометьте на пленке ориентацию и маркировку фильтра.
11. Совместив маркированную рентгеновскую пленку с исходной чашкой, выявите те колонии, в которых произошла гибридизация.

Литература

Grunstein M., Hogness D. S., 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene, Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3961.

Методика 22

Внесение метки α-^{32}P в ДНК с помощью ник-трансляции

Объемы приведены из расчета, что реакцию проводят в 25 мкл.

Буфер для ник-трансляции

50 мМ трис- HCl (pH 7,5)
10 мМ $MgSO_4$
1 мМ ДТТ
50 мкг/мл БСА

I. Реакция

1. H_2O; объем=20 мкл — (объем раствора ДНК, добавленного в пробирку от микрофуги).

2. 2,5 мкл буфера NT для ник-трансляции 10×:
   0,5 М трис (pH 7,5)
   0,1 М $MgSO_4$
   10 мМ ДТТ
   500 мкг/мл БСА
3. 2,5 мкл раствора, содержащего по 0,2 мМ всех dNTP, кроме того, который мечен ^{32}P.
4. 0,5 мкг ДНК (или менее).
5. 0,5 мкл разведенной ДНКазы (см. разд. III в данной методике).
6. Перенесите эту реакционную смесь в пробирку от микрофуги, в которой находится dNTP, меченный ^{32}P (см. разд. II данной методики).
7. 0,1 мкл раствора очищенной до гомогенности ДНК-полимеразы I *E. coli* с концентрацией 2 мг/мл.
8. Инкубируйте около 3 ч при 14°С.
   Обычно реакция протекает следующим образом. В начальный период включения метки не происходит, затем следует быстрое линейное увеличение включения, замедление включения, плато, а затем снижение количества включенной метки, причем иногда оно происходит быстро. Прекращайте реакцию на стадии замедленного роста включения или на стадии плато. В ДНК должно включиться по крайней мере 25% метки.
9. Остановите реакцию. Добавьте 25 мкл раствора:
   0,02 М Na_3-ЭДТА.
   2 мг/мл ДНК-носителя (обработанной ультразвуком тимусной ДНК)
   0,2% ДСН.

II. Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP)

1. Немеченые dNTP: конечная концентрация в 25 мкл равна 20 мкМ.
2. ^{32}P-dNTP (обычно dCTP). Сполосните полипропиленовую пробирку от микрофуги на 1,5 или 0,5 мл этанолом, высушите. В эту пробирку внесите меченный ^{32}P dNTP в 50%-ном этаноле. Закройте пробирку парафильмом. В пленке сделайте три-четыре отверстия. Высушите под вакуумом при комнатной температуре. Конечная концентрация в 25 мкл равна 1—5 мкМ (~50 мкКи).

III. ДНКаза

1. Исходный раствор: ДНКаза в концентрации 1 мг/мл в 50 мМ трис (pH 7,5), 10 мМ $MgSO_4$, 1 мМ ДТТ и 50% глицерола при —20°С.
2. 0,5 мкл исходного раствора ДНКазы разводят до 100 мкл буфером для ее разведения [50 мМ трис (pH 7,5), 10 мМ

$MgSO_4$, 1 мМ ДТТ, 50 мкг/мл БСА]. 0,5 мкл этого разведенного раствора разводят дальше. Разведения проводят при 0°С.

а. Чтобы получить зонд для гибридизации, 0,5 мкл этого раствора разводят в 100 мкл (общее разведение 1 : 40 000). Длина дуплексов в зонде оказывается менее 5 kb.

б. Для получения меченой двухцепочечной ДНК длиной 20 kb 0,5 мкл разводят в 1 мл (общее разведение 1 : 400 000).

IV. Проверка включения ^{32}P в ДНК

1. Добавьте <0,1 мкл реакционной смеси в стеклянную пробирку на 5 мл, содержащую 100 мкл ДНК-носителя с концентрацией 500 мкг/мл.
2. Отберите 10 мкл и капните их на фильтр GFC диаметром 24 мм.
3. а. К остальной пробе добавьте 1 мл 1 М HCl и 0,1 М пирофосфата натрия.
   б. Пробу подержите во льду в течение 10 мин.
   в. Фильтруйте через фильтр GFC диаметром 24 мм. Промойте HCl, затем этанолом.
4. Высушите оба фильтра.
5. Просчитайте на ручном счетчике или на более точном счетчике.
6. Если оба фильтра считают одинаково, то эффективность включения составляет 10%. Обычно включение составляет 25—50%.

V. Выделение меченой ДНК

А. 1. Нанесите реакционную смесь на колонку 0,7×20 см (Bio-Rad Econo-column) с сефадексом G-50, предварительно уравновешенным буфером ТЕ (10 мМ трис и 1 мМ Na_3-ЭДТА, pH 7,5). Сухой сефадекс G-50 набухает 3 ч.

2. Промойте буфером ТЕ (10 мМ трис и 1 мМ Na_3-ЭДТА, pH 7,5).

3. Вытекающую жидкость собирайте порциями по 0,5 мл в полипропиленовые пробирки. ДНК обычно элюируется после 2 мл промывки. За положением ДНК, меченной ^{32}P, в колонке можно следить, пользуясь ручным счетчиком.

4. Соберите первый пик, отбросив хвост.

Б. 1. Проколите крышку и дно полипропиленовой центрифужной пробирки на 0,5 мл иглой номер 27. (Сделайте одно отверстие в дне и четыре в крышке).

2. Вставьте проткнутую пробирку в полипропиленовую центрифужную пробирку на 1,5 мл со снятой крышкой.

3. Во внутреннюю пробирку внесите 100 мкл биогеля Р60

(50—100 меш), суспендированного в 10 мМ трис (pH 7,5), 1 мМ Na_3-ЭДТА, 0,2% ДСН.

Сверху наслоите 300—400 мкл биогеля P60 (100—200 меш), суспендированного в том же буфере.

4. Всю эту конструкцию из пробирок поставьте в клиническую центрифугу (если необходимо, все это можно поместить в другую пробирку).
   а. Центрифугируйте в течение 2 мин при 1000 об/мин.
   б. Добавьте 100 мкл буфера для промывки: 10 мМ трис (pH 7,5), 1 мМ Na_3-ЭДТА, 0,2% ДСН.
   в. Центрифугируйте в течение 2 мин при 1000 об/мин.
   г. Внутреннюю пробирку вставьте в чистую наружную пробирку.
   д. Образец разведите до 50 мкл и нанесите на биогель.
   е. Центрифугируйте в течение 2 мин при 1000 об/мин.
   ж. Добавьте 50 мкл буфера для промывки и центрифугируйте.
   з. В нижней пробирке собирается около 100 мкл ДНК, меченной ^{32}P.
5. При центрифугировании на высокой скорости через отверстие в дне пробирки могут пройти зерна P60. Чистоту центрифуги от радиоактивности проверьте с помощью ручного счетчика.

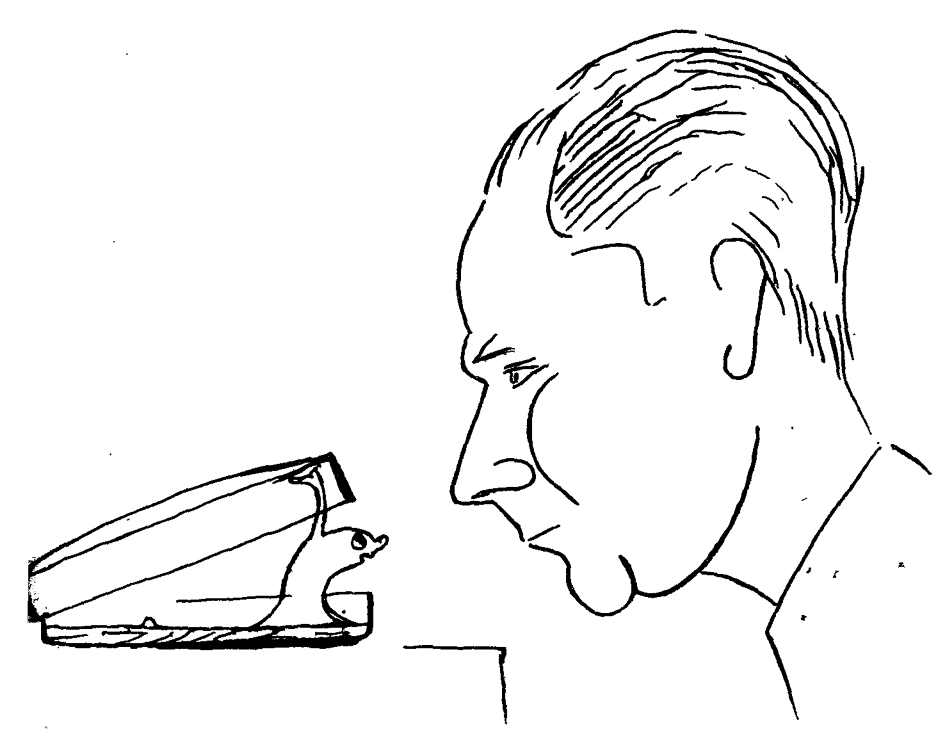
VI. Общие замечания

Выше описывалось, как проводить реакцию в объеме 25 мкл. Можно успешно проводить реакцию и в объемах менее 10 мкл.

Большинство коммерческих препаратов ДНК-полимеразы I *E. coli* содержит существенные примеси ДНКазы, так что добавление ДНКазы (разд. III данной методики) может оказаться ненужным.

Литература

Rigby P. W. J., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P., 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I, J. Mol. Biol., 113, 237.



Какой сюрприз! Участник фаговых курсов 1951 г. Вацлав Шибальский явно испугался, когда обнаружил, что колония сильно слизистого устойчивого к хлорамфениколу мутанта *E. coli* выросла от поверхности агара до самой крышки чашки Петри [Microbial Genetics Bull., № 5, 10 (1951)]. Этому способствовала только что разработанная методика градиентных чашек [Science, **116**, 46—48 (1952)].

Методика 23

Гибридизация с иммобилизованной ДНК или РНК на твердом носителе

1. В полипропиленовую пробирку внесите зонд (меченный ^{32}P или ^{125}I с помощью ник-трансляции), растворенный в буфере ТЕ [10 мМ трис (pH 7,5), 1 мМ Na_3-ЭДТА). Используйте зонд в количестве, соответствующем примерно 10^6—$5 \cdot 10^6$ расп./мин.

2. а. Чтобы денатурировать ДНК, прогрейте в течение 10 мин при 95°С.

или

б. Добавьте 1/10 объема 1 М NaOH. Через 10 мин добавьте 1/10 объема 1,8 М трис-HCl и 0,2 М трис-основание.
3. Поместите фильтры с иммобилизованной ДНК или РНК в пластиковый мешочек, который можно заварить.
4. а. Добавьте примерно 4 мл раствора, содержащего буфер SSPE 5×+0,3% ДСН, 100 мкг/мл денатурированной и разрушенной ультразвуком ДНК-носителя (из спермы лосося) и 50% (об/об) формамида (MCB), в расчете на 100 $см^2$ фильтра.

или

б. Проведите предварительную обработку фильтра. Поместите его в мешочек, который можно заварить, и в расчете на фильтр площадью 100 $см^2$ добавьте 4 мл раствора, содержащего 50% (об/об) формамида (MCB), SSPE 5×, BFP 5× [BFP 1×=0,02% (в/об) бычьего сывороточного альбумина, фиколла (мол. вес 400 000) и поливинилпирролидона], 1% глицина и 100 мкг/мл денатурированной и обработанной ультразвуком ДНК-носителя (из спермы лосося). Инкубируйте при 42°С не менее 1 ч. Удалите раствор, использованный при такой предварительной обработке. Для фильтра площадью 100 $см^2$ приготовьте 4 мл раствора, содержащего 50% (об/об) формамида, SSPE 5×, BFP 1×, 100 мкг/мл денатурированной и обработанной ультразвуком ДНК-носителя (из спермы лосося), 10% (в/об) натриевой соли декстрансульфата 500 [можно приготовить исходный раствор 50% (в/об)] и 0,3% ДСН. Половину этого раствора добавьте в мешочек с фильтром и перемешайте. К оставшейся половине добавьте денатурированный зонд, хорошо перемешайте и все это добавьте в мешочек. Натриевую соль декстрансульфата можно не добавлять.

или

в. На фильтр площадью 100 $см^2$ добавьте около 4 мл раствора, содержащего SSPE 5×+0,3% ДСН и 100 мкг/мл денатурированной и обработанной ультразвуком ДНК-носителя (из спермы лосося).
5. Добавьте денатурированную ДНК-зонд в количестве ~10^6 расп./мин. Следите, чтобы ^{32}P не попал на тот участок мешочка, где его будете заваривать. Заварите мешочек.
6. Герметизированный мешочек (мешочки) поместите в другой мешочек и тоже заварите его. Чтобы не допустить высыха-

ния фильтра, в наружный мешочек положите влажное бумажное полотенце.

7. а—б. Если гибридизацию проводите в 50%-ном растворе формамида, то ведите ее в течение 3—48 ч при 42°С.

или

в. Если гибридизацию проводите в водной среде, то ведите ее при 65°С в течение 3—24 ч.

8. Удалите из мешочка радиоактивную гибридизационную смесь. Ее можно использовать для повторных гибридизаций (см. обсуждение).
9. Разрежьте мешочек и выньте фильтр.
10. а. Промойте три-четыре раза, инкубируя с покачиванием при 45°С по 5—15 мин в 250 мл раствора SSPE 2×+0,2% ДСН.

или

б. Промойте три-четыре раза, инкубируя при 37°С по 5—15 мин в 250 мл раствора 20 мМ $Na_{1,5}H_{1,5}PO_4$+0,2% ДСН и 1 мМ Na_3-ЭДТА.

или

в. Промойте три-четыре раза, инкубируя по 5—15 мин при комнатной температуре в 250 мл 10 мМ $Na_{1,5}H_{1,5}PO_4$+ +0,2% ДСН и 1 мМ Na_3-ЭДТА.

11. Высушите фильтр, заверните его в пластик и экспонируйте с рентгеновской пленкой. Для того чтобы маркировать и ориентировать фильтр, можно завернуть вместе с ним в пластик кусочек бумаги, надписанный радиоактивными чернилами. (См. методику 24.)

BFP 100×=2% (в/об) бычьего сывороточного альбумина, фиколла и поливинилпирролидона.

Буфер SSPE:

0,18 М NaCl
10 мМ $(Na_{1,5})PO_4$
1 мМ Na_2-ЭДТА
pH 7,0

Буфер SSPE 20× (на 1 л):

Na_2-ЭДТА	7,4 г	20 мМ
NaOH (50 %)	8,8 мл	0,16 М
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	27,6 г	0,2 М
NaCl	210 г	3,6 М

Обсуждение

Приведенные выше условия гибридизации разработаны для проведения гибридизации с уникальной последовательностью бактериальной ДНК, когда на фильтр из геля элюировано в сумме около 1 мкг бактериальной ДНК. Если вносится больше меченого зонда, то можно получить более сильный сигнал и уменьшить время гибридизации. При использовании зонда, меченного ^{125}I для получения низкого фона, гибридизацию надо вести в течение не более трех часов. Неизвестно, почему при использовании меченной ^{125}I тРНК^{Tyr} при длительной гибридизации получается высокий фон.

Если используемый зонд гомологичен ДНК высших животных, то в качестве носителя нужно использовать не ДНК из спермы лосося, а какую-нибудь другую, например бактериальную, ДНК. ДНК-носитель можно добавить прямо в зонд, и тогда ее не нужно дополнительно добавлять при гибридизации.

Двухцепочечную ДНК можно денатурировать любым способом. Однако если концентрация соли в ней выше, чем в буфере ТЕ, то мы рекомендуем проводить денатурацию щелочью. Если зонд повторно используется после длительной гибридизации в водном растворе, его можно денатурировать NaOH. Добавьте к зонду 1/10 объема 1,5 М NaOH и через 10 мин добавьте 1/10 объема 1,5 М HCl. Если зонд в формамиде, то можно использовать тепловую денатурацию. Зонд становится наполовину ренатурированным в соответствии с таким уравнением:

Время, за которое происходит наполовину ренатурация в формамиде (в часах) = 0,05 · (объем в мл) · (сложность зонда [kb]) / (вес зонда [мкг]).

Так как одна из участвующих в гибридизации нуклеиновых кислот-партнеров иммобилизована на твердой подложке, то трудно предсказать время, необходимое для оптимальной или хотя бы достаточной для выявления гибридизации. Лучше всего определить это время эмпирически.

Основная вариабильность результатов, получаемых при использовании этой методики, определяется материалом и качеством фильтров. Обычно для посадки одноцепочечной ДНК используют нитроцеллюлозные фильтры фирм Millipore (HAWP 000 10) или Schleicher and Schuell (BA85). Однако от партии к партии фильтров количество ДНК, связывающейся с ними, и уровень фона варьируют.

Для того чтобы блокировать адсорбцию на фильтре меченой одноцепочечной ДНК-зонда, достаточно присутствия ДСН и ДНК-носителя. Как правило, при проведении обычной гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах не обязательно использовать раствор BFP.

Методика 24

Радиоавтография ^{32}P, связавшегося с фильтром

1. Чтобы не загрязнить экраны и кассеты, заверните фильтр в пластиковую пленку.
2. Завернутый фильтр положите на дно кассеты для рентгеновской пленки размером 20×25 см (8×10 дюймов; кассеты 200024 Picker). Убедитесь, что пластиковая пленка не торчит из кассеты.
3. К крышке кассеты прикрепите усиливающий экран [Dupont Cronex Lightning-Plus ZC; 224-156 без зажимов, размер 8×10 дюймов (20×25 см)].
4. В темной комнате положите в кассету лист пленки Kodak X-Omat R или Dupont Cronex 4 размером 8×10 дюймов (20×25 см). Чувствительность пленки Cronex 4 в два-четыре раза ниже чувствительности пленки X-Omat R, однако она имеет большее разрешение.
5. Перед тем как включить свет, закройте кассету и заприте ее. Заверните кассету в алюминиевую фольгу и положите в морозильную камеру на —70°С.
6. Экспонируйте в течение от нескольких часов до нескольких дней.
7. Перед проявлением пленки выньте кассету из морозильной камеры. Прежде чем развернуть алюминиевую фольгу, согрейте кассету до комнатной температуры. Это необходимо для того, чтобы на пленке не произошло конденсации и чтобы не повредился усиливающий экран.
8. В темной комнате снимите алюминиевую фольгу, откройте кассету и выньте пленку.
9. Проявляйте в проявителе для рентгеновской пленки.

   Окуните на 5 мин в готовый проявитель Kodak для рентгеновской пленки,

   на 1 мин в останавливающий раствор (3%-ная уксусная кислота),

   на 10 мин в быстрый фиксаж.

   на 15 мин в проточную воду.

   Высушивайте пленку, повесив ее.

Методика 25

Выделение ДНК из агарозного геля

I. Использование стеклянных фильтров

1. Для разделения нужных фрагментов ДНК проведите электрофорез в агарозном геле, используя трис-ацетатный или трис-фосфатный буфер (см. методику 20) с 0,5 мкг/мл бромистого этидия.
2. Осветите длинноволновым УФ-светом лишь узкую полоску геля, чтобы УФ не повредил основной гель. Вырежьте из геля кусок, содержащий полосу ДНК.
3. К этому кусочку геля добавьте такое количество буфера PPE [6 *M* $NaClO_4$, 50 м*M* $Na_{1,5}H_{1,5}PO_4$ (pH 7), 10 м*M* Na_3-ЭДТА], чтобы конечная концентрация $NaClO_4$ была $\geqslant 5$ *M*.
4. Такой препарат поместите на 37°С. Кусочек геля будет всплывать, так что пробирку с препаратом нужно периодически переворачивать. Для максимального выхода нужно, чтобы гель полностью растворился. Поэтому инкубируйте в течение 30—60 мин.
5. Поместите фильтр ватман GFC диаметром 8 мм в стеклянный аппарат для фильтрования. Включите слабый вакуум и автоматической пипеткой нанесите на фильтр GFC 1 мл буфера PPE. Подберите такое разряжение, чтобы скорость протекания была около 0,5 мл/мин.
6. Нанесите растворенный образец на фильтр GFC. Поддерживайте скорость протекания около 0,5 мл/мин.
7. Сполосните пробирку, в которой находился образец, 1 мл PPE и нанесите эту жидкость на фильтр.
8. Сполосните фильтр 1 мл PPE, а затем 2—3 мл 100%-ного этанола при комнатной температуре (скорость протекания при желании можно увеличить).
9. Удалите избыток жидкости, но не высушите фильтр.
10. Сложите фильтр в четыре раза. Положите его в пробирку от микрофуги на 0,5 мл, дно которой проколото иглой номер 27. Довольно плотно затолкайте фильтр на дно пробирки. Эту пробирку с фильтром поместите в пробирку от микрофуги на 1,5 мл со снятой крышкой.
11. Элюируйте ДНК с фильтра, добавив к нему 10—20 мкл буфера ТЕ (10 м*M* трис и 1 м*M* Na_2-ЭДТА, pH 7,5). Оставьте фильтр намоченным примерно на 1 мин. После этого поместите пробирки в микрофугу и центрифугируйте в течение 15 с. В пробирке на 1,5 мл ДНК окажется на дне. Два раза добавляйте по 10—20 мкл ТЕ и центрифугируйте. Элюируе-

мая в ТЕ ДНК расщепляется большинством рестриктирующих эндонуклеаз.

Буфер PPE: 6 М $NaClO_4$, 50 мМ $Na_{1,5}H_{1,5}PO_4$ (pH 7), 10 мМ Na_3-ЭДТА.

Обсуждение

1. Эта методика основана на том, что при высокой концентрации $NaClO_4$ ДНК прилипает к фильтрам GFC.
2. Может оказаться существенным источник $NaClO_4$. Некоторые партии $NaClO_4$ препятствуют связыванию ДНК с фильтрами.
3. Наличие PO_4 в растворе $NaClO_4$, по-видимому, повышает выход ДНК. В отсутствие PO_4 некоторое количество ДНК остается на фильтре и не элюируется с него.
4. Фильтр GFC диаметром 8 мм связывает 2 мкг ДНК. Емкость фильтра прямо пропорциональна используемой площади.
5. Для ДНК меньших размеров выход выше. Обычно выход таков:

Размер ДНК, kb	*Выход, %*
40 000	40—65
10 000	50—75
5000	50—80
⩽ 1000	50—90

Литература

Chen C. W., Thomas C. A., Jr., 1980. Recovery of DNA segments from agarose gel, Anal. Biochem., **101**, 339.
McDonell M., St. John T. (личное сообщение).

II. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности KI

1. Отделите нужный фрагмент, проведя электрофорез в агарозном геле. Используйте трис-ацетатный или трис-фосфатный буфер (см. методику 20), содержащий 0,5 мкг/мл бромистого этидия.
2. Осветите длинноволновым УФ-светом лишь небольшую полоску геля, чтобы УФ не повредил основной гель. Вырежьте кусочек геля, содержащий ДНК, и взвесьте его.
3. Растворите гель в насыщенном растворе KI.
4. Добавьте бромистый этидий до конечной концентрации около 50 мкг/мл.
5. Доведите плотность до 1,5 г/мл.

Показатель преломления $\eta_{20}=0{,}1731\cdot\rho+1{,}1617$ (выполняется для $1{,}3\leqslant\rho\leqslant1{,}7$).

6. Центрифугируйте до достижения равновесия при 30 000 об/мин и 20°С в течение 24—48 ч.

Литература

Blin N., Gabain A. V., Bujard H., 1975. Isolation of large molecular weight DNA from agarose gels for further digestion by restriction enzymes, FEBS Lett., 53, 84.

III. Электроэлюция ДНК в гидроксилапатит

1. С помощью электрофореза в агарозном геле отделите нужный фрагмент. Используйте трис-ацетатный буфер (методика 20), содержащий 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Слейте из аппарата столько буфера, чтобы поверхность геля оказалась выше его уровня.
2. Осветите гель длинноволновым УФ-светом и разглядите полосы ДНК. *Непосредственно перед нужной полосой* вырежьте лунку шириной 1—2 мм.
3. Заполните эту лунку плотной взвесью гидроксилапатита HTP Bio-Rad (в трис-ацетатном буфере для электрофореза). Заполните лунку доверху, добавляя взвесь по мере осаждения частиц.
4. Осторожно залейте гель буфером и продолжайте электрофорез. Освещая гель длинноволновым УФ-светом, следите за движением полосы ДНК из геля в гидроксилапатит.
5. После того как полоса полностью выйдет из геля, прекратите электрофорез. Пользуясь пастеровской пипеткой, перенесите гидроксилапатит в другую пастеровскую пипетку, которая заткнута силиконизированной стеклянной ватой и закреплена таким образом, что получилась маленькая колонка.
6. Промойте эту колонку пятью объемами (обычно 5 раз по 200 мкл) буфера 10 мМ KPO_4 (pH 6,8) с 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Промойте еще пятью объемами буфера 100 мМ KPO_4 с 0,5 мкг/мл бромистого этидия.
7. Элюируйте ДНК буфером 400 мМ KPO_4 с 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Собирайте небольшие фракции (~50 мкл) и следите за флуоресценцией под длинноволновым УФ-светом.
8. Объедините фракции, которые содержат ДНК. Проведите экстракцию фенолом, насыщенным буфером.
9. Отберите водную фазу. Диализуйте ее в течение ночи против 10 мМ трис-HCl (pH 8) и 1 мМ Na_3-ЭДТА.

Литература

Tabak H. F., Flavell R. A., 1978. A method for the recovery of DNA from agarose gels, Nucleic Acids Res., 5, 2321.

Методика 26

Быстрая оценка концентрации ДНК с использованием бромистого этидия

I. Метод с использованием чашки с агарозой

1. В чашки Петри разлейте по 10 мл 1%-ного раствора агарозы с 0,5 мкг/мл бромистого этидия в любом удобном буфере с низкой концентрацией соли (можно использовать, например, оставшийся после приготовления геля раствор).
2. На чашку с агарозой нанесите каплей 1—10 мкл того раствора ДНК, концентрацию которого нужно определить.
3. Каплями нанесите такие же объемы каких-нибудь препаратов ДНК с известной концентрацией. Наносите их в определенном порядке, начиная с концентрации около 0,5 мкг/мл и вплоть до 20 мкг/мл.
4. Оставьте чашки, чтобы капли впитались в агарозу. (Чашки оставляют на разное время — начиная с 15 мин и кончая перерывом в работе на ночь.)
5. Сфотографируйте под коротковолновым УФ-светом и сравните интенсивность флуоресценции.
6. Если концентрация ДНК в исследуемом препарате оказалась выше 20 мкг/мл, то сделайте несколько разведений и вновь сравните их с образцами, концентрация которых известна.
7. Препарат ДНК может содержать небольшие молекулы, которые мешают определить концентрацию ДНК, вызывая усиление флуоресценции (например, небольшие молекулы РНК) или гася флуоресценцию бромистого этидия (например, сахароза, ДСН, $NaClO_4$ или формамид). В этом случае оставьте чашку на ночь, и тогда эти соединения, препятствующие определению концентрации ДНК, диффундируют в окружающую агарозу.

II. Метод с использованием пластиковой пленки, натянутой на кольцо

1. Натяните пластиковую пленку на кольцо (например, на ободок пластиковой чашки Петри с удаленным дном).
2. На пленку каплями одинакового объема нанесите растворы ДНК с 1 мкг/мл бромистого этидия. Сравните капли, как было описано выше в методе I.
3. Для чистой ДНК лучшим оказывается метод II, а для препаратов ДНК с примесью низкомолекулярных соединений, которые мешают определению концентрации,— метод I.

Методика 27

Электронная микроскопия ДНК

I. Водная методика

А. *Метод расправления*

1. Расправляющий раствор. Используйте 30 мкл раствора: 5 мкл 5 *М* ацетата аммония и 1 мг/мл цитохрома *с*, 25 нг ДНК,
   H_2O до конечного объема 50 мкл.
2. Нижняя фаза (0,25 *М* ацетат аммония).

Б. *Метод капли*

1. 3,5 мкл 5 *М* ацетата аммония и 1 мг/мл цитохрома *с*.
2. 25 нг ДНК.
3. H_2O до конечного объема 50 мкл. Поместите каплю на тефлон или любую другую несмачиваемую поверхность. Коснитесь сеточкой боковой стороны капли. Этот метод дает лучшие результаты в случае небольших ДНК (например, ДНК фага φX174 или вируса SV-40).

В. *Окрашивание*

1. В 10 мл 90%-ного этанола добавьте 10 мкл уранилацетата (0,05 *М* уранилацетат и 0,05 *М* HCl в H_2O).
2. Храните закрытым, в темноте.
3. Окрашивайте сеточки в течение 30 с.
4. Споласкивайте 5 с в 90%-ном этаноле.

Литература

Davis R. W., Simon M. N., Davidson N., 1971. Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids, Methods Enzymol., **21D**, 413.

Ferguson J., Davis R. W., 1978. Quantitative electron microscopy of nucleic acids. In: Advanced techniques in biological electron microscopy II (Koehler J. K., ed.), p. 123.

II. Формамидная методика

А. 1. *Расправляющий раствор.* Используйте 50 мкл раствора: 10 мкл 1 *М* трис-HCl (pH 8,5), 0,1 *М* Na_2-ЭДТА и 0,5 мг/мл цитохрома *с*,

25 нг ДНК,
H_2O до конечного объема 60 мкл,
40 мкл формамида.

2. *Нижняя фаза* (приготавливается не ранее чем за 5 мин до использования):
0,01 *М* трис и 10^{-3} *М* Na_2-ЭДТА (pH 8,5) (100 мл), 10%-ный формамид (10 мл).

Б. *Окрашивание*

1. В 10 мл 90%-ного этанола добавьте 10 мкл основного раствора уранилацетата (0,05 *М* уранилацетат и 0,05 *М* HCl в H_2O).
2. Храните закрытым, в темноте.
3. Окрашивайте сеточки в течение 30 с.
4. Промывайте по 5 с в 90%-ном этаноле.

В. *Изоденатурирующие условия* (для ряда расправляющих растворов и нижних фаз)

Расправляющий раствор	*Нижняя фаза*
1. 30%-ный раствор формамида 0,1 *М* трис (pH 8,5) 0,01 *М* Na_2-ЭДТА	5%-ный раствор формамида 0,01 *М* трис (pH 8,5) 0,001 *М* Na_2-ЭДТА
2. 40%-ный раствор формамида 0,1 *М* трис (pH 8,5) 0,01 *М* Na_2-ЭДТА	10%-ный раствор формамида 0,01 *М* трис (pH 8,5) 0,001 *М* Na_2-ЭДТА
3. 50%-ный раствор формамида 0,1 *М* трис (pH 8,5) 0,01 *М* Na_2-ЭДТА	20%-ный раствор формамида 0,01 *М* трис (pH 8,5) 0,001 *М* Na_2-ЭДТА
4. 60%-ный раствор формамида 0,1 *М* трис (pH 8,5) 0,01 *М* Na_2-ЭДТА	30%-ный раствор формамида 0,01 *М* трис (pH 8,5) 0,001 *М* Na_2-ЭДТА
5. 70%-ный раствор формамида 0,1 *М* трис (pH 8,5) 0,01 *М* Na_2-ЭДТА	40%-ный раствор формамида 0,01 *М* трис (pH 8,5) 0,001 *М* Na_2-ЭДТА
6. 80%-ный раствор формамида 0,05 *М* трис (pH 8,5) 0,005 *М* Na_2-ЭДТА	50%-ный раствор формамида в дистиллированной воде

Литература

Davis R. W., Hyman R. W., 1971. A study in evolution: Homology between coliphages T7 and T3, J. Mol. Biol., 62, 287.

Davis R. W., Simon M. N., Davidson N., 1971. Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids, Methods Enzymol., **21D**, 413.

Методика 28

Обычная методика образования гетеродуплексов

I. Образование гетеродуплексов

1. 20 мкл H_2O (минус объем препарата фага или ДНК).
2. 0,1 мкг каждой ДНК (можно в виде фага).
3. 0,5 мкл 1 *М* Na_4-ЭДТА.
4. 2,5 мкл 1 М NaOH.
5. Выдержите в течение 10—30 мин при 25°С.
6. 2,5 мкл 1,8 М трис-HCl и 0,2 М трис-основание (pH 7,2).
7. 25 мкл формамида.
8. Инкубируйте в течение 20—60 мин при 25—40°С.

II. Электронная микроскопия гетеродуплексов

А. *Расправляющий раствор*

1. 10 мкл препарата гетеродуплексов.
2. 10 мкл раствора, содержащего 1 *М* трис, 0,1 *М* Na_2-ЭДТА (pH 8,5) и 0,5 мг/мл цитохрома *с*.
3. 45 мкл H_2O.
4. 35 мкл формамида.
5. Наливайте 50 мкл.

Б. *Нижняя фаза* (приготавливается не ранее, чем за 5 мин до использования)
0,01 *М* трис и 10^{-3} *М* Na_2-ЭДТА (pH 8,5), 10%-ный раствор формамида.

Литература

Davis R. W., Davidson N., 1968. Electron-microscopic visualization of deletion mutations, Proc. Natl. Acad. Sci., **60**, 243.

Davis R. W., Simon M. N., Davidson N., 1971. Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids, Methods Enzymol., **21D**, 413.

Ferguson J., Davis R. W., 1978. Quantitative electron microscopy of nucleic acids. In: Advanced techniques in biological electron microscopy II (Koehler J. K., ed.), vol. 2, p. 123, Springer-Verlag, Berlin.

Westmoreland B. C., Szybalski W., Ris H., 1969. Mapping of deletions and substitutions in heteroduplex DNA molecules of bacteriophage lambda by electron microscopy, Science, **163**, 1343.

Методика 29

Выделение ферментных препаратов из клеток, лизогенных по фагу λc1857 Sam7

I. Методики, общие для всех ферментов

А. *Выращивание клеток и индукция*

Вырастите клетки в бульоне LB или в среде с дрожжевым экстрактом Ardamine Z и Cerelose B1 (Panasenko et al., 1978). Клетки выращивайте при 30°C до мутности $A_{600}=0,6$ (при усиленной аэрации можно выращивать до мутности 1,0). В течение 15—20 мин прогрейте культуру при 42°С, а затем выращивайте еще в течение 2,5—3 ч при 37°С. Следите за тем, чтобы в процессе роста поддерживалось pH>7.

Б. *Сбор клеток*

Осадите клетки центрифугированием, взвесьте пастообразный осадок клеток. Ресуспендируйте клетки в 1/100 исходного объема раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,5) и 10% сахарозы. Заморозьте, опустив в жидкий азот, и храните при температуре —70°С.

В. *Лизис*

Используйте методику лизиса в тепле (Scott and Kornberg, 1978). Дайте клеткам оттаять и добавьте такое количество раствора триса с сахарозой, чтобы на 1 л лизирующего буфера приходилось 150 г клеток. При этом оставьте место, чтобы можно было добавить

сульфат аммония до 5% насыщения,
спермидин-Cl_3 до 20 мМ,
Na_2-ЭДТА до 20 мМ,
ДТТ до 1 мМ.

Сухим или 2М трис-основанием доведите pH до 8. Добавьте лизоцим до концентрации 0,2 мг/мл и инкубируйте во льду в течение 30 мин. Для достижения полного лизиса прогревайте порциями по 250 мл в водяной бане на 37°С в течение 5 мин (температура препарата при этом возрастет не до 37°С, а всего лишь примерно до 15°С).

Лизат центрифугируйте в течение 3 ч при 20 000 об/мин в роторе JA-20, в течение 90 мин при 25 000 об/мин в роторе SW-27 или в течение 60 мин при 40 000 об/мин в роторе 60 Ti или 45 Ti.

Литература

Panasenko S. M., Alazard R. J., Lehman I. R., 1978. A simple threestep procedure for the large scale purification of DNA ligase from a hybrid λ lysogen constructed in vitro, J. Biol. Chem., **253**, 4590.

Scott J. F., Kornberg A., 1978. Purification of the rep protein of *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., **253**, 3292.

II. Очистка ДНК-полимеразы I из лизата клеток *E. coli* 594 (см. список штаммов)

А. *Фракционирование*

К надосадочной жидкости, содержащей сульфат аммония в концентрации 5% от насыщения, добавьте сухой сульфат аммония (0,25 г/мл). Помешивайте 1 ч при 4°С, после чего центрифугируйте в течение 30 мин при 10 000 об/мин в роторе JA-14. Осадок отбросьте. К надосадочной жидкости, которая содержит сульфат аммония в концентрации 47% от насыщения, добавьте сухой сульфат аммония (0,16 г/мл), перемешайте и центрифугируйте (Richardson et al., 1964). Осадок ресуспендируйте в буфере, содержащем 200 мМ $NaPO_4$ (pH 6,5) и 1 мМ ДТТ. Разведите так, чтобы ионная сила раствора стала приемлемой, и пропустите его в этом же буфере через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой DE-52 (объемом 0,5—1,0 мл на 1 г клеток).

Б. *Хроматография на фосфоцеллюлозе*

То, что протекло через ДЭАЭ-целлюлозу DE-52, диализуйте против 20 мМ KPO_4 (pH 6,5) и 1 мМ ДТТ. Нанесите на колонку с фосфоцеллюлозой Р-11 (объемом 0,5—1,0 мл на 1 г клеток), уравновешенной тем же буфером. Промойте таким количеством буфера 20 мМ, который равен объему колонки, а затем таким же количеством буфера 50 мМ KPO_4 и 1 мМ ДТТ. Элюируйте градиентом концентрации буфера 50—250 мМ (с 1 мМ ДТТ). Элюируйте объемом, равным 7—8 объемам колонки. Объедините пиковые фракции (пик белка в середине градиента) и осадите сульфатом аммония (85% насыщения, или 0,6 г/мл). Осадок ресуспендируйте в таком объеме 100 мМ KPO_4 (pH 7,0), чтобы концентрация белка составила 10 мг/мл.

В. *Хроматография на сефадексе G-100*

Набейте колонку с сефадексом G-100 (объем сефадекса в колонке должен быть ⩾25 объемов наносимого образца). Уравновесьте сефадекс буфером для колонки (100 мМ KPO_4 pH 7,0). Нанесите образец и следом пустите буфер для колонки. Объедините пиковые фракции. Пик должен элюиро-

ваться сразу же после исключенного объема. При желании можно сконцентрировать препарат, как было описано выше.

Препараты храните замороженными при —70°С в том виде, как они были элюированы с последней колонки (Jovin et al., 1969). Небольшой объем можно хранить примерно в течение года при —20°С, добавив равный объем глицерина.

Г. *Определение активности*

Проба для определения активности содержит 50 мМ трис (рН 7,5), 10 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл активированной (обработанной ультразвуком) ДНК тимуса теленка или спермы лосося, по 20 мкМ каждого dNTP и около 100 000 имп./мин α-^{32}P-dCTP или dGTP. Одна единица фермента соответствует включению примерно 10% метки в кислотонерастворимый материал за 3 мин при 37°С в пробе объемом 100 мкл. (1 ед. активности дает включение 10 моль за 30 мин, с поправкой на нуклеотидный состав.) При таком способе определения активности чистый фермент обладает удельной активностью около 2500 ед./мг.

Литература

Jovin T. M., Englund P. T., Bertsch L. L., 1969. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid, J. Biol. Chem., **244**, 2996.

Richardson C. C., Schildkraut C. L., Vasken Aposhian H., Kornberg A., 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid, J. Biol. Chem., **39**, 222.

III. ДНК-лигаза фага Т4 из лизата клеток *E. coli* E1150 (см. список штаммов)

А. *Фракционирование*

К надосадочной жидкости, содержащей сульфат аммония в концентрации 5% от насыщения, добавьте сухой сульфат аммония (0,33 г/мл). Помешивайте на холоду в течение 1 ч, центрифугируйте 30 мин при 10 000 об/мин в роторе JA-14. Ресуспендируйте осадок в буфере, содержащем 25 мМ трис (рН 7,2), 0,3 М NaCl и 1 мМ ДТТ. Разведите таким образом, чтобы ионная сила соответствовала 0,3 М NaCl и пропустите через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой DE-52 (0,5—1,0 мл смолы на 1 г клеток) в этом же буфере.

Б. *Фракционирование на Р-11 и DE-52*

Диализуйте препарат против буфера, содержащего 25 мМ трис (рН 7,2) и 1 мМ ДТТ. Нанесите образец на колонку с фосфоцеллюлозой Р-11 (0,5—1,0 мл смолы на 1 г клеток), уравновешенной этим же буфером. Промойте ко-

лонку таким количеством этого буфера, который равен двум объемам колонки. Промойте буфером+0,15 M NaCl в количестве, равном двум объемам колонки. Элюируйте буфером с 0,75 M NaCl. Белок, элюированный с колонки, диализуйте против буфера, содержащего 25 мМ трис (рН 7,2) и 1 мМ ДТТ. Выпавший при диализе белковый осадок отцентрифугируйте и отбросьте. Препарат нанесите на колонку с DE-52 (0,5 мл смолы на 1 г клеток), промойте буфером 25 мМ трис (рН 7,2) и 1 мМ ДТТ в количестве, равном двум объемам колонки. Элюируйте этим же буфером плюс 0,3 M NaCl.

В. *Хроматография на гидроксилапатите*

Элюат с DE-52 прямо наносите на колонку с гидроксилапатитом (0,5 мл смолы на 1 мг белка), уравновешенным буфером, содержащим 25 мМ трис (рН 7,2), 1 мМ ДТТ и 0,3 M NaCl. Промойте этим буфером в количестве, равном двум объемам колонки. Элюируйте градиентом концентрации сульфата аммония 0—0,5 M в буфере с 0,3 M NaCl. Лигаза (>95% чистоты) выходит в единственном основном белковом пике.

Г. *Определение активности*

Удобный, но отнюдь не количественный метод определения активности лигазы состоит в том, что замыкаются в кольца небольшие кольцевые молекулы ДНК, расщепленные такой рестриктирующей эндонуклеазой, которая приводит к образованию липких концов и которая свободна от примеси фосфатазы и экзонуклеазы. Более традиционные методы тестирования активности описаны в приведенных ниже работах (Weiss et al., 1968; Modrich and Lehman, 1970). По-видимому, с помощью большинства методов нельзя правильно определить активность лигазы до тех пор, пока препарат не будет первый раз очищен на DE-52. После очистки на Р-11 активность препарата можно правильно определить уже любым способом.

Литература

Modrich P., Lehman I. R., 1970. Enzymatic joining of polynucleotides, J. Biol. Chem., **245**, 3626.

Weiss B., Jasquemin-Sablan A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C., 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, J. Biol. Chem., **243**, 4543.

Раздел III

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Среды, концентрации лекарственных препаратов, пищевые добавки

I. Среды

А. *Среда LB (Луриа-Бертани)*

На 1 л	Триптон Bacto	10 г
	Дрожжевой экстракт Bacto	5 г
	NaCl	5 г
Для чашек	Агар Bacto	15 г
Для верхнего агара		7 г

Б. *Среда для фага λ*

На 1 л	Триптон Bacto	10 г
	NaCl	5 г
Для чашек	Агар Bacto	12 г
Для верхнего агара		7 г

В. *Среды с агарозой* (для использования при выделении ДНК быстрым методом)

Вместо агара Bacto в обычной прописи используйте 10 г агарозы на 1 л для нижнего слоя агарозы и 6 г агарозы на 1 л для верхнего слоя агарозы.

Г. *Индикаторные чашки Green*

На 1 л	Триптон Bacto	8 г
	Дрожжевой экстракт Bacto	1 г
	NaCl	15 г
	Агар Bacto	15 г

Автоклавируйте и затем добавьте стерильные растворы:

40 %-ная глюкоза	34 мл
2,5 %-ный ализариновый желтый	25 мл
2 %-ный анилиновый голубой	6,6 мл

Ализариновый желтый G и GG производятся фирмой MCB, а анилиновый голубой — фирмой Fisher. Непосредственно перед использованием раствор ализаринового желтого следует прогреть, так как при комнатной температуре этот краситель нерастворим.

Д. *Чашки Red* (для выявления образования β-лактамазы)

На 1 л	Триптиказа (BBL)	10 г
	NaCl	5 г
	Агар Bacto	10 г

Автоклавируйте, а затем добавьте:

1—5 мг ампициллина в зависимости от партии. Ампициллина должно быть добавлено столько, чтобы только-только подавить чувствительные клетки;

25 мг хлористого 2,3,5-трифенилтетразолия,

33 мл стерильного 30%-ного раствора глюкозы.

Е. *Супербульон*

На 1 л	Триптон Bacto	33 г
	Дрожжевой экстракт Bacto	20 г
	NaCl	7,5 г
	10 М NaOH	3,5 мл

Ж. *Среда с триптиказой и ЭДТА*

На 1 л	Триптиказа (BBL)	10 г
	NaCl	5 г
Для чашек	Агар Bacto	10 г
Для верхнего агара		6,5 г

З. *Среда Е* (минимальная среда Фогеля — Боннера)

Для приготовления 1 л среды Е 50× растворяйте в воде при температуре не ниже 45°С указанные ниже соли (в том порядке, в котором они приведены). Храните с хлороформом и стерилизуйте после того, как разведете.

На 1 л среды Е 50× :	Дистиллированная вода	670 мл
	$MgSO_4 \cdot 7HO_2$	10 г
	Лимонная кислота·1 H_2O	100 г
	K_2HPO_4 безводный	500 г
	$NaHNH_4PO_4 \cdot 4H_2O$	175 г

Жидкая среда. Разведите в 50 раз, простерилизуйте и добавьте необходимые сахара и пищевые добавки.

Для чашек. Приготовьте равные объемы среды Е 2× и 3%-ного агара Bacto, автоклавируйте их по отдельности и добавьте необходимые сахара и пищевые добавки.

И. *Среда NCE* (среда Е без углерода или без цитрата)

Этой средой пользуются в тех случаях, когда в селективной среде должен использоваться какой-нибудь источник углерода, отличный от глюкозы или цитрата. Клетки *Salmonel-*

la могут использовать цитрат, добавленный в среду E в качестве хелатирующего соединения. Поэтому для *Salmonella* нужно применять минимальную среду без цитрата. Если исключить из концентрата среды NCE $MgSO_4$ и добавлять его в среду уже после ее разведения, то можно приготовить среду NCE, концентрированную в 50 раз.

NCE 50×(1 л)	KH_2PO_4	197 г
	$K_2HPO_4 \cdot H_2O$	325,1 г
	$Na(NH_4)HPO_4 \cdot H_2O$	175 г
	H_2O	925 мл
Раствор $MgSO_4$ 1000×	$MgSO_4$	265,5 г
(1 *M* $MgSO_4$ для среды NCE)	H_2O	1000 мл

Чтобы приготовить среду NCE 2×, смешайте
1 л H_2O,
40 мл концентрированной среды NCE 50×,
2 мл раствора $MgSO_4$ 1000×.

Автоклавируйте эту смесь, добавьте равный объем расплавленного агара 2× (3%-ного), добавьте источник углерода (обычно до конечной концентрации 1%) и разливайте чашки.

К. *Среда М9*

На 1 л	$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	6 г
	KH_2PO_4	3 г
	NaCl	0,5 г
	NH_4Cl	1 г

Автоклавируйте, затем добавьте стерильные растворы:

1 *M* $MgSO_4$	1 мл
0,01 *M* $CaCl_2$	10 мл

(Если используете обычный неочищенный агар, то $CaCl_2$ можно не добавлять.)

Для чашек. Приготовьте равные объемы среды М9 2× и 3%-ного агара Bacto. Автоклавируйте по отдельности, смешайте и добавьте сахар (например, 0,2%-ный раствор глюкозы или мальтозы) и необходимые пищевые добавки. Для приготовления верхнего агара М9 смешайте равные объемы автоклавированных по отдельности среды М9 2× и 1,3%-ного агара Bacto. Иногда при длительном хранении верхнего агара М9 (или при повторном его плавлении) образуется тонкий преципитат. Такой преципитат безвреден.

Л. *Чашки Мак-Конки*

На 1 л Основной агар Мак-Конки (Difco) 40 г
Автоклавируйте, затем добавьте сахар до 1%. Фирма Difco производит также среду, уже содержащую лактозу.

М. *Чашки ЭМС*

На 1 л	Основной агар EMB (Difco)	27,5 г
или		
	Триптон Bacto	10 г
	Дрожжевой экстракт Bacto	1 г
	NaCl	5 г
	KH_2PO_4	2 г
	Агар Bacto	15 г
Автоклавируйте, затем	добавьте стерильные растворы:	
	4%-ный раствор эозинового желтого	10 мл
	0,65%-ный раствор метиленового синего, сахар до 1%	10 мл

Н. *Селективные чашки Бохнера* (для отбора мутантов Tet^S)

Раствор А	Триптон Bacto	10 г
	Дрожжевой экстракт Bacto	5 г
	Хлортетрациклин·HCl	50 мг
	Агар	15 г
	H_2O	500 мл
Раствор Б	NaCl	10 г
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	10 г
	Глюкоза	2 г
	H_2O	500 мл

Растворы А и Б автоклавируйте по отдельности при давлении 1,05 атм в течение 20 мин (важно выдержать время). Смешайте и охладите до такой температуры, при которой можно разливать чашки. Добавьте 5 мл $ZnCl_2$ (20 мМ). Добавьте также *либо* 6 мл фузаровой кислоты (с концентрацией 2 мг/мл), *либо* 10 мл хинальдиновой кислоты (с концентрацией 10 мг/мл).

О. *Агар для столбиков*

На 1 л	Питательный бульон (Difco)	8 г
	Агар Bacto	6 г

Автоклавируйте (или нагрейте в микроволновой печи), тщательно перемешайте. Разлейте по флаконам и затем автоклавируйте, чтобы простерилизовать. Не нужно разливать стерильную среду по стерильным флаконам, не проводя после этого повторной стерилизации.

П. *Среда λYM*

Эта среда состоит из бульона для фага λ, 0,01%-ного дрожжевого экстракта и 0,2%-ного раствора мальтозы. Она

часто упоминается в литературе, но обычно ее можно заменить средой TYM.

P. *Бульон TYM*

Это бульон LB, содержащий 0,2% мальтозы. Для этого в бульон добавляют 1/100 объема стерильного 20%-ного раствора мальтозы.

C. *Среда для разведения фага λ*

10 мМ трис-HCl (pH 7,5) и 10 мМ $MgSO_4$. Иногда для длительного хранения препаратов фага λ рекомендуется добавить NaCl до 50 мМ и желатину до 0,01%. Это особенно полезно, если фаг был очищен в растворе CsCl.

T. *Забуференный физиологический раствор*

0,85% (в/об) NaCl и 0,066 М $NaPO_4$ (pH 7,0).

II. Концентрации антибиотиков

Обычно в богатые среды добавляют больше антибиотика, чем в минимальные. Исключение составляют те чашки, которые используются в опытах по трансформации. Рекомендуем следующие конечные концентрации: для богатых сред — тетрациклина 20 мкг/мл, ампициллина 50 мкг/мл; для минимальных сред и для сред, используемых в опытах по трансформации,— тетрациклина 10 мкг/мл и ампициллина 25 мкг/мл.

III. Пищевые добавки

Ниже приведен список пищевых добавок, которые часто используются при работе с бактериями. Основные растворы приготавливают так, чтобы нужная конечная концентрация получалась при добавлении 5 мл основного раствора к 1 л среды. Лимитирующей является такая концентрация добавки, при которой нуждающийся в ней ауксотроф будет образовывать крошечные колонии, легко отличимые от колоний клеток дикого типа. Добавление 5 мл основного раствора на 1 л среды обеспечивает нормальный рост ауксотрофа.

Пищевая добавка	Концентрация в чашке, мМ	Низкая концентрация, мМ	Основной раствор, %	Мл/л для низкой концентрации, %	Стерилизация[1]	Примечания
Аденин	5,0	0,001	1,35		Ф	0,1 нHCl
Аденозин	5,0	0,001	2,67		А	
Аланин	0,47		0,84		А	
Аргииин	0,6	0,01	2,53	0,86	А	
Аспарагин	0,32		0,84		Ф	
Аспартат калия	0,3		1,0		Ф	
Биотии	0,1		0,49		А	
Валин	0,3		0,7		А	
Гистидин	0,1	0,005	0,31	0,25	А	
Гистидинол	1,0		4,28		А	
Глицин	0,13		0,2		А	
Глутамат натрия	5,0				Ф	
Глутамин	5,0		14,6		А	
Гуанин	0,3		0,91		А	в 1 нHCl
Гуанозин	0,3		1,7		А	
Диаминопимелиновая кислота	0,1		0,38		А	
Изолейцин	0,3		0,79		А	
Лейцин	0,3	0,005	0,79	0,086	А	
Лизии	0,3	0,005	1,1	0,086	А	
Метионин	0,3		0,9	0,086	А	
Никотиновая кислота	0,1		0,25		А	
Пантотенат кальция	0,1		0,48		А	
Пиридоксин·HCl	0,1		0,41		А	
Пролин	2,0	0,002	4,6	0,005	А	
Серин	4,0	0,01	8,4	0,0125	А	
Тиамин	0,05		0,337		А	
Тимин	0,32		0,81		А	
Тирозин	0,1		0,36		Ф	
Треонин	0,3		0,71		А	
Триптофан	0,1		0,41		Ф	
Урацил	0,1	0,003	0,224	0,15	А	
Уридин	0,1	0,003	0,488		А	
Фенилаланин	0,3		0,99		А	0,01 нHCl
Цистеин	0,3		0,73		Ф	
ЭГТА	10,0		2 М		А	Нейтрализовать

[1] А — автоклавирование, Ф — фильтрование.

Приложение 2

Диагностика ауксотрофов (ауксанография)

Состав этих чашек показан в таблице, которая приводится ниже. Все пищевые добавки используются в тех конечных кон-

центрациях, которые указаны в приложении 1. Состав сред 1—5 приводится в таблице по вертикали, а сред 6—10 — по горизонтали. Среда 11 содержит соединения, отсутствующие в других средах. Ее состав приведен внизу таблицы. В обсуждении приводятся некоторые замечания относительно использования этих сред.

	1	2	3	4	5
6	Аденозин	Гуанозин	Цистеин	Метионин	Тиамин
7	Гистидин	Лейцин	Изолейцин	Лизин	Валин
8*	Фенилаланин	Тирозин	Триптофан	Треонин	Пролин
9	Глутамин	Аспарагин	Урацил	Аспарагиновая кислота	Аргинин
10	Тимин	Серин	Глутаминовая кислота	Диаминопимелиновая кислота	Глицин
11	Пиридоксин	Никотиновая кислота,	биотин,	пантотенат,	Аланин

* См. примечание 5 в обсуждении.

Обсуждение

1. Некоторые мутанты, нуждающиеся в пуринах, растут на аденозине или гуанозине; такие мутанты будут расти на смесях 1, 2 и 6.
2. Некоторым мутантам, нуждающимся в пуринах, необходимы аденозин+тиамин. Такие мутанты будут расти только на смеси 6.
3. Мутанты *pyrA* нуждаются в урациле и аргинине. Они растут только на смеси 9.
4. Мутанты, которым необходимы изолейцин+валин, будут расти только на смеси 7. При работе с *E. coli* K12 в смесь 5 необходимо добавить изолейцин, так как в отсутствие изолейцина все штаммы K12 чувствительны к валину.
5. Те мутанты, у которых блокирована ранняя стадия пути биосинтеза ароматических аминокислот, будут расти только на смеси 8. Кроме веществ, перечисленных в списке, среда 8 содержит также парааминобензойную кислоту и дегидробензойную кислоту, что необходимо для роста мутантов, у которых блокирован синтез ароматических аминокислот.
6. Мутанты, у которых блокированы ранние стадии пути биосинтеза лизина, растут только на смеси 4.
7. Смесь 11 удовлетворяет в основном потребности в витаминах.
8. Растворы приведенных выше смесей (1—11) можно приготовить концентрированными в 10 раз.

9. Используйте соли глутаминовой и аспарагиновой кислот.
10. Растворы глутамина и аспарагина не автоклавируйте.
11. Растворы, содержащие триптофан, храните в темноте.
12. Смесь 9 содержит 20 мМ глутамина, а смесь 1 — только 5 мМ. Те штаммы, которые нуждаются в высокой концентрации глутамина (например, мутанты glnA), будут расти лишь на среде 9.

Приложение 3

Хранение бактерий, фагов и ДНК

I. Хранение бактерий и фагов

А. *Хранение фагов*

Обычно пользуются двумя методами хранения. Ауксотрофы (в том числе со вставками Tn*10*) и множественно маркированные штаммы с относительно стабильным генотипом можно хранить в столбиках во флакончиках при комнатной температуре. Для мутантов со вставками Tn*5*, у которых накапливаются дополнительные копии этого транспозона, данный метод непригоден. Такие мутанты, штаммы Hfr и штаммы с нестабильными геномами рекомендуется хранить при низкой температуре (—70°С), как это описано ниже.

Б. *Хранение фагов*

Лизаты фага P22 (методика 2) обычно стабильны при 4°С в хорошо забуференной среде с кальцием и магнием. Лизаты мутанта HT124 фага P22 (мутант, характеризующийся повышенной частотой трансдукции) несколько менее стабильны — возможно, из-за изменения структуры капсида под действием мутации HT. Лизаты фага λ (см. методику 2) можно хранить при 4°С с каплей $CHCl_3$. Титр такого лизата, однако, может за год упасть на порядок. В течение длительного времени препараты фагов P22(HT) и λ хранят при низкой температуре, как это описано ниже.

II. Методики хранения

4. Столбики во флакончиках при комнатной температуре

Флакончики	Емкость ~ 2 мл (0,5 драхмы), размер 12×35 мм
Крышки	Бакелитовые с резиновыми прокладками
Этнкетки	Для флакончиков, хранящихся при комнатной температуре, пользуйтесь этикетками Kum Klean. Этикетки Time и Shamrock не отклеиваются при низкой температуре, и ими можно пользоваться и при хранении при —70°C.
Среда	Питательный бульон (Difco) 2 г
	Агар 1,5 г
	H_2O 250 мл

Б. Подготовка флакончиков

Среду нагревают до полного расплавления агара. Пользуясь репетером, разлейте ее по флакончикам (по 1,2 мл во флакончик). Закройте флакончики крышками и автоклавируйте (они не лопаются). До использования храните флакончики при 4°С.

В. Использование флакончиков

Ту культуру, которую хотите сохранить, внесите уколом в мягкий агар. Пользуйтесь иглой аппликатора или иглой для инокуляции. Горлышко флакончика с резьбой погрузите в расплавленный парафин и плотно заверните крышку, пока парафин не застыл. Герметизация парафином предотвратит высыхание. В таких флакончиках культуры могут храниться свыше 10 лет.

Г. Хранение фагов и бактерий при низкой температуре

Как фаги, так и бактерии можно хранить в 7%-ном растворе ДМСО (или в 15%-ном глицерине) при —70°С. Для этого приготавливают стерильные пробирки с 70 мкл ДМСО (или 150 мкл глицерина). Во флакончик пипеткой наливают 1 мл суспензии фага или свежей культуры бактерий и перемешивают. Флакончик закрывают крышкой и помещают на —70°С.

Когда берете фаг или клетки из культуры, хранящейся при —70°С, не нужно оттаивать флакончик. Откройте его и стерильной иглой поскребите поверхность замороженного материала. Рассейте штрихом на подходящую среду или бактериальный газон. Флакончик же можно опять закрыть крышкой и снова поставить на —70°С.

III. Хранение ДНК

При обработке и хранении ДНК и РНК важно учитывать следующие свойства реактивов и условий.

1. *Тяжелые металлы* способствуют разрыву фосфодиэфирных связей.
2. Na_2-ЭДТА прекрасно хелатирует ионы тяжелых металлов.
3. При pH выше 7 *цитрат* уже не обладает буферной емкостью и лишь очень слабо хелатирует металлы. Цитрат используют по причинам чисто историческим, его использование не дает никаких преимуществ. Поэтому мы от него отказались.
4. При облучении и в результате химического расщепления образуются *свободные радикалы.* Они вызывают разрывы фосфодиэфирных связей.
5. *УФ-лучи.* Облучение светом с длиной волны 260 нм вызывает различные повреждения, в том числе приводит к образованию тиминовых димеров и поперечных сшивок. При этом падает биологическая активность. Облучение светом с длиной волны 320 нм также вызывает образование поперечных сшивок, но с меньшей эффективностью.
6. *Диэтилпирокарбонат и диэтилоксидиформат.* Эти соединения вызывают включение в одноцепочечные нуклеиновые кислоты карбэтоксильных групп, что приводит к утрате биологической активности. С двухцепочечными нуклеиновыми кислотами они, как правило, не реагируют при комнатной температуре.
7. *Низкие значения pH* вызывают депуринизацию, но этот процесс характеризуется высокой энергией активации.
8. *Бромистый этидий* вызывает фотоокисление ДНК при облучении ее видимым светом в присутствии молекулярного кислорода. Он хорошо захватывает свободные радикалы.
9. *Фенол.* Продукты его окисления могут вызывать разрывы фосфодиэфирных связей.
10. *Эфир.* Перекиси вызывают, по-видимому, разрывы фосфодиэфирных связей.
11. *Формамид.* Большинство водных растворов формамида со временем закисляется (до pH 5). Поскольку процесс катализируется щелочью, то лучше забуферить раствор формамида около pH 7 с помощью фосфата или PIPES. Если РНК находится в формамиде дольше нескольких дней, то в ней обнаруживается некоторое количество разрывов фосфодиэфирных связей.
12. *Этанол.* В отсутствие тяжелых металлов этанол не вызывает повреждений ДНК.
13. *Нуклеазы.* У людей на кожном покрове присутствуют нуклеазы. Поэтому старайтесь, чтобы пальцы не приходили в прямой или опосредованный контакт с нуклеиновыми кислотами. В большинстве своем ДНКазы не очень стабильны. Однако многие РНКазы чрезвычайно устойчивы. РНКаза

может сорбироваться на стекле или пластике и оставаться при этом активной.

14. *5°С*. Это одна из наиболее подходящих для хранения ДНК температур.
15. *—20°С*. При этой температуре происходит интенсивное образование одно- и двухцепочечных разрывов. Соль в растворах ДНК вымораживается, а точка замерзания насыщенного раствора соли примерно соответствует тем температурам, которые получаются в большинстве морозильных камер при их циклической работе. В результате ДНК подвергается многократным циклам замораживания — оттаивания.
16. *—70°С*. Это, по-видимому, лучшая температура для длительного хранения. Помните, однако, что в замороженном состоянии повреждающее действие свободных радикалов может быть гораздо выше.

Хранить ДНК в течение длительного времени лучше всего в растворах с высокой концентрацией соли ($\geqslant$1 М), высокой концентрацией Na_2-ЭДТА ($\geqslant$10 мМ) при pH 8,5 (трис-буфер).

Очень хорошо хранить ДНК в растворе CsCl с бромистым этидием, плотность которого соответствует плавучей плотности ДНК, при 5°С в темноте (завернув сосуд в алюминиевую фольгу). При этих условиях за год происходит разрыв примерно одной фосфодиэфирной связи на 200 kb ДНК.

ДНК фага λ лучше сохраняется в частицах фага, чем в виде очищенной ДНК. В фаговых частицах в растворе CsCl с плотностью, соответствующей плавучей плотности фага, ДНК может храниться в течение 5 лет, и при этом не выявляется каких-либо ее повреждений (менее одного разрыва на 200 kb).

Приложение 4

Буферы и растворы

I. Буферы

Буфер	pK_a (20°С)	ΔpK_a/°С	Мол. масса	Молярность насыщенного раствора при 0°С
PIPES	6,80	— 0,0085	342	1,4
MOPS	7,20	— 0,006	209	3,0
TES	7,50	— 0,020	229	2,6
HEPES	7,55	— 0,014	238	2,2
HEPPS	8,00	— 0,007	252	2,5
Трис	8,30	— 0,031	121	2,4

Литература

Good N. E., Winget G. D., Winter W., Connolly T. N., Izawa S., Singh K. M. M., 1966. Hydrogen ion buffers for biological research, Biochemistry, 5, 467.

pH	Количество трис, моль	
	Трис-HCl	Трис-OH
7,2	0,889	0,111
7,3	0,867	0,133
7,4	0,837	0,163
7,5	0,804	0,196
7,6	0,767	0,233
7,7	0,724	0,276
7,8	0,673	0,327
7,9	0,618	0,382
8,0	0,562	0,438
8,1	0,509	0,491
8,2	0,448	0,552
8,3	0,389	0,611
8,4	0,334	0,666
8,5	0,280	0,720
8,6	0,232	0,768
8,7	0,190	0,810
8,8	0,156	0,844
8,9	0,122	0,878
9,0	0,096	0,904

pH буферов (при использовании эквимолярных количеств кислотной и основной форм):
HCl/KCl = 1,4
Глицин-HCl/глицин = 2,5
Муравьиная кислота/муравьинокислый натрий = 3,7
Лимонная кислота/цитрат натрия = 4,6
Уксусная кислота/ацетат натрия = 4,7
Какодиловая кислота/какодилат натрия = 6,2
KH_2PO_4/Na_2HPO_4 = 6,9
NH_4Cl/NH_4OH = 9,4
Глицин/глицинат натрия = 9,7
$NaHCO_3/Na_2CO_3$ = 10,4
pH стандартных растворов при 25°С:
0,1 M HCl = 1,10
Насыщенный раствор KH-тартрата = 3,56
25 мМ KH_2PO_4 + 25 мМ Na_2HPO_4 = 6,86

0,01 М бура=9,18
Насыщенный раствор $Ca(OH)_2$=12,45
0,1 М NaOH=12,88

II. Концентрации растворов

Растворы CsCl
Зависимость плотности раствора CsCl от показателя преломления:

$\rho < 1,38$ $\rho_{25} = 10,2402 \cdot \eta_{25} - 12,6483$
$\rho > 1,37$ $\rho_{25} = 10,8601 \cdot \eta_{25} - 13,4974$

Зависимость молярности раствора CsCl от его плотности

$$M = 8\ (\rho^{25} - 1)$$

Насыщенный раствор CsCl при 25°C ≅ 1,92 г/мл, или 7,36 М
Плотность белка ≅ 1,3
Плотность углеводов ≅ 1,5—2,0
Растворы нуклеозидтрифосфатов

ATP-$Na_2 \cdot 2H_2O$	587,2 г/моль	dATP-$(NH_4)_3 \cdot 2H_2O$	578,3 г/моль
GTP-$Na_2 \cdot 2H_2O$	603,2 г/моль	dGTP-$(NH_4)_3 \cdot 1,5H_2O$	585,3 г/моль
UTP-$Na_3 \cdot 4H_2O$	622,2 г/моль	dTTP-Li_3	500,0 г/моль
CTP-$Na_2 \cdot 4H_2O$	599,2 г/моль	dCTP-$Ri_3 \cdot 2H_2O$	485,1 г/моль

ATP $A_{259} = 1,54 \cdot 10^4$ M^{-1} $см^{-1}$ при pH 7
GTP $A_{253} = 1,37 \cdot 10^4$ M^{-1} $см^{-1}$ при pH 7
UTP $A_{262} = 1,00 \cdot 10^4$ M^{-1} $см^{-1}$ при pH 7
CTP $A_{271} = 9,1 \cdot 10^3$ M^{-1} $см^{-1}$ прн pH 7

Перед хранением основные растворы следует нейтрализовать до pH 7—8. Растворы тринатриевых солей имеют pH около 7.
Растворы нуклеиновых кислот
Двухцепочечная ДНК или РНК $A_{260} \cong 1$ для раствора 50 мкг/мл
Одноцепочечная ДНК или РНК $A_{260} \cong 1,3$ для раствора 50 мкг/мл
Плотность двухцепочечной ДНК-=([молярное содержание G+C]+14,19)/8,63≅1,7 г/мл
Плотность РНК≅1,9 г/мл
Плотность фага λ≅1,5 г/мл

Растворы белков

$A_{280} \cong 1,0$ для раствора с концентрацией 1 мг/мл
ДНК-лигаза фага T4 $A_{280}^{0,1\%} = 1,0$
ДНК-полимераза *E. coli* $A_{280}^{0,1\%} = 0,85$
Если имеется примесь нуклеиновой кислоты, то концентрация белка в растворе (в мг/мл) равна 1,5 A_{280}—0,75 A_{260}

Приложение 5

Подготовка трубок для диализа

1. Отрежьте кусок трубки нужной длины (10—20 см).
2. Прокипятите в буфере $NaHCO_3$:

339 г безводной соды на 1 л воды
14 г Na_2-ЭДТА на 1 л воды.

3. Промойте внутреннюю часть трубки дистиллированной водой.
4. Прокипятите в 10^{-3} М Na_3-ЭДТА.
5. Храните при 5°С.
6. Перед использованием трубки промойте ее внутри дистиллированной водой.
7. Всегда работайте с трубкой только в перчатках.

Приложение 6

Измерение объемов, единицы

I. Измерение микролитровых объемов

А. *Автоматические пипетки Gilson* (Р20 и Р200)

Пипеткой Р20 можно отбирать от 1 до 20 мкл, а пипеткой Р200 — от 20 до 200 мкл. В наконечнике этих пипеток имеется большой мертвый объем воздуха. Если температура жидкости, в которую погружают наконечник, отличается от температуры воздуха, то объем воздуха в наконечнике изменится, и это приведет к ошибке в объеме отбираемой жидкости. Всегда медленно возвращайте поршень в верхнее положение. Не допускайте, чтобы поршень резко отскочил вверх. Чтобы в наконечник набрался полный объем жидкости, подождите 1—2 с.

Б. *Микрошприцы*

1. Hamilton 710-SN на 100 мкл, диаметр 6 мм, размер канала 20, игла со скошенным концом.
2. Hamilton 705-SN на 50 мкл, диаметр 6 мм, размер канала 20, игла со скошенным концом.
3. Glenco 19 909-10-2×26 на 10 мкл, диаметр 6 мм, размер канала 26, игла со скошенным концом.
4. Hamilton 7101N на 1 мкл.

К шприцам на 100 и на 50 мкл можно присоединить тонкостенный полиэтиленовый или тефлоновый шланг с внутренним диаметром 0,034 дюйма (~0,086 см). Обычно для этого используют трубки Intermedic PE 90 (Clay Adams). К шприцам на

10 мкл и на 1 мкл можно присоединить тонкостенную трубочку из полиэтилена или тефлона с внутренним диаметром 0,015 дюйма ($\sim$0,038 см). Обычно используют трубки Intermedic PE 20 (Clay Adams). Шприцом на 1 мкл пользуются в основном для того, чтобы отбирать небольшие количества ферментных препаратов. При этом 0,1 мкл отбирается обычно с точностью $\pm$20%.

Микрошприцы обладают меньшим мертвым воздушным объемом, чем автоматические пипетки, и потому характеризуются, как правило, большей точностью. Следует периодически очищать металлический поршень в шприцах на 100, 50 и 10 мкл (но не в шприце на 1 мкл). Для этого выньте поршень. Сполосните корпус шприца и поршень ацетоном, а затем водой. Если поршень сильно загрязнен, то он может застрять и (или) поцарапать корпус шприца. Обычно в канале корпуса шприца имеются тонкие царапины, которые видны по преломлению света. Из-за них в шприц может подтекать воздух, что приводит к неточности в измерении объема. Если из-за сильного износа вдоль поршня подтекает воздух, то смажьте канал корпуса шприца и поршень небольшим количеством глицерина.

II. Температура плавления ДНК

1. *Влияние нуклеотидного состава и соли*

$T_{пл} = 16{,}6\ \lg(Na^+) + 0{,}41\%(G + C) + 81{,}5,$ (уравнение 1)
Для ДНК фага $\lambda b2$ содержание $G + C = 51\%$,
$T_{пл} = 85{,}8°C$ при 0,1 *M* NaCl,
$T_{пл} = 97{,}4°C$ при 0,5 *M* NaCl.

2. *Влияние формамида*
1% формамида понижает $T_{пл}$ на 0,65°C.
3. *Значение гомологии в ДНК*
Каждый процент негомологичности последовательности ДНК понижает $T_{пл}$ на 1,5°C.
4. *Влияние длины ДНК*
Уменьшение длины двухцепочечной молекулы ДНК приводит к снижению температуры плавления. Температура плавления коротких ДНК вычисляется следующим образом:

$$T_{пл}\ \text{короткого дуплекса} = T_{пл}\ \text{длинного дуплекса (уравнение 1)} - \frac{500}{\text{Число пар оснований в коротком дуплексе}}$$

III. Время осветления

Ротор JA-21, 18×10 мл		Ротор JA-20, 8×50 мл		Ротор JS-13, 4×50 мл		Ротор JA-14, 6×250 мл		Ротор JA-10, 6×500 мл		Ротор JS-7,5, 4×250 мл	
Тыс. об/мин	С	Тыс. об/мин	С	Тыс. об/мин	С	Тыс. об/мин	С	Тыс. об/мин	С	Тыс. об/мин	С
2	580	2	770	2	800	2	820	2	900	2	1200
4	140	4	190	4	200	4	200	3	400	3	520
5	92	5	120	5	130	5	130	4	230	4	290
6	64	6	86	6	90	6	90	5	140	5	190
8	36	8	48	8	50	8	51	6	100	6	130
10	23	10	31	10	32	10	32	7	74	7	95
12	16	12	21	11	26	11	27	8	56	7,5	83
14	12	14	16	12	22	12	22	9	45		
16	9	16	12	13	19	13	19	10	36		
18	7	18	9			14	17				
20	6	20	8								
21	5										

Для центрифуги Eppendorf 3200 (12 000 об/мин) для пробирок на 1,5 мл С = 8,0,
для пробирок на 0,5 мл С = 7,6,

Время осветления в часах = 100 С/s, где s — коэффициент седиментации, а С = К/100.
Ротор JA-21 примерно соответствует ротору SE-12, ротор JA-20 — ротору SS-34, ротор JA-14 — ротору GSA, ротор JS-13 — ротору HB-4, ротор JA-10 — ротору GS-3 и ротор JS-7,5 — ротору HS-4.

$$K = \frac{\ln \dfrac{R_{\max}}{R_{\min}}}{w^2} \cdot \frac{10^{13}}{3600} \qquad K = \frac{2{,}5 \cdot 10^5 \ln \dfrac{R_{\max}}{R_{\min}}}{(\text{тыс. об/мин})^2}$$

ДНК фага λ S ≅ 34

Частицы фага λ S ≅ 400

Клетки *E. coli* S ≅ 10^5

IV. Единицы

1 мкг = 1γ = 10^{-6} г
1 нг = 10^{-9} г
1 kb = 1000 оснований одноцепочечной нуклеиновой кислоты
1 kb = 1000 пар оснований двухцепочечной нуклеиновой кислоты
1 kb = $6{,}6 \cdot 10^5$ дальтон (Да) двухцепочечной ДНК (натриевая соль)
1 kb = $3{,}3 \cdot 10^5$ Да одноцепочечной ДНК (натриевая соль)
1 kb = $3{,}4 \cdot 10^5$ Да одноцепочечной РНК (натриевая соль)
1 kb ДНК может кодировать 333 аминокислоты, или примерно молекулу массой 37 000 Да.
Белок в 10 000 Да = 270 пар оснований ДНК
Белок в 30 000 Да = 810 пар оснований ДНК
Белок в 50 000 Да = 1,35 kb ДНК
Белок в 100 000 Да = 2,7 kb ДНК
Белок в 200 000 Да = 5,4 kb ДНК
1 мкг/мл нуклеиновой кислоты = 3,0 мкМ фосфата
1 мкг/мл нуклеиновой кислоты длиной в 1 kb = 3 нМ концов
1 OD двухцепочечной нуклеиновой кислоты = 1,0 $A_{260} \cong 50$ мкг/мл
1 OD одноцепочечной нуклеиновой кислоты = 1,0 $A_{260} \cong 40$ мкг/мл

Приложение 7

Расщепление рестриктирующими эндонуклеазами

I. Методика

1. В полипропиленовую пробирку от микрофуги внесите 18 мкл H_2O (минус объем раствора ДНК).
2. Добавьте 2 мкл буфера для рестрикции 10× (с высокой, средней или низкой концентрацией соли; для подбора буфера см. разд. II).
3. Добавьте необходимое количество ДНК в 10 мМ трис (pH 7,4) и 1 мМ Na_2-ЭДТА.
4. Добавьте рестриктазу. Обычно 1 ед. фермента расщепляется 1 мкг ДНК за 15 мин. Хорошо перемешайте.
5. Инкубируйте в течение 30 мин при той температуре, которая указана в разд. II (см. ниже) (обычно при 37°C).
6. Прогрейте в течение 5 мин при 70°C, чтобы инактивировать рестриктазу и ферментные примеси, а также чтобы расплавить липкие концы у ДНК фага λ.

II. Свойства рестриктирующих эндонуклеаз

Фермент	Концентрация соли	Температура, °C	Активность после выдерживания 5 мин при 70°C	Последовательность	Число сайтов в λ	Число сайтов в pBR322
*Acc*I	Средняя	37		GT′ $\binom{AG}{CT}$ AC	7	2
*Alu*I	»	37		AG′CT	>50	16
*Asu*I				G′GNCC	>30	15
*Ava*I	»	37		G′PyCGPuG	8	1
*Ava*II	»	37		G′G $\binom{A}{T}$ CC	>17	8
*Avr*II	Низкая	37		CCTAGG	2	0
*Bal*I				TGG′CCA	15	1
*Bam*HI	Средняя	37	+	G′GATCC	5	1
*Bbv*I	Низкая	37		GC $\binom{T}{A}$ GC	>30	21
*Bcl*I	Средняя	60	+	T′GATCA	7	0
*Bgl*I	»	37		GCCNNNN′NGGC	22	3
*Bgl*II	»	37		A′GATCT	5	0
*Bpa*I				GT′ $\binom{C}{A}$ $\binom{G}{T}$ AC	7	1
*Bpu*I					6	2
*Bst*EII	»	60	+	G′GTNACC	11	0
*Bst*NI	Низкая	60	+	CC′ $\binom{A}{T}$ GG	>35	6
*Cla*I				AT′CGAT	12	1
*Dde*I	Средняя	37		C′TNAG	>50	8
*Eco*RI	Высокая	37	—	G′A$\overset{*}{A}$TTC	5	1
*Eco*RII	»	37		′CC $\binom{A}{T}$ GG	>35	6
*Fnu*4HI	Низкая	37		GC′NGC	>50	42
*FnuD*II	»	37		CG′CG	>50	23
*Hae*I	»			$\binom{A}{T}$ GG′CC $\binom{T}{A}$	—	7
*Hae*II	»	37		PuGCGC′Py	>30	11
*Hae*III	»	37		GG′$\overset{*}{C}$C	>50	22
*Hga*I	Средняя	37		GACGCNNNNN′ CTGCGNNNNNNNNNN′	>50	11
*Hgi*AI	Высокая	37		G $\binom{T}{A}$ GC $\binom{T}{A}$′ C	20	8
*Hha*I	Средняя	37		GCG′C	>50	31
*Hinc*II	»	37		GTPy′PuAC	34	2
*Hind*II	»	37		GTPy′PuAC	34	2
*Hind*III	»	37	+	A′AGCTT	6	1
*Hinf*I	»	37		G′ANTC	>50	10
*Hpa*I	Низкая	37		GTT′AAC	11	0
*Hpa*II	»	37		C′$\overset{*}{C}$GG	>50	26
*Hph*I	»	37		GGTGANNNNNNNN′ CCACTNNNNNNN′	>50	12
*Kpn*I	»	37	—	GGTAC′C	2	0
*Mbo*I	Высокая			′GATC	>50	22

Фермент	Концентрация соли	Температура, °C	Активность после выдерживания 5 мин при 70° C	Последовательность	Число сайтов в λ	Число сайтов в pBR322
*Mbo*II	Низкая	37		GAAGANNNNNNNN' CTTCTNNNNNNN'	>50	11
*Mnl*I	Высокая	37		CCTC	>50	26
*Msp*I	Низкая	37		C'CGG	>50	26
*Mst*I				TGCGCA	>10	4
*Pst*I	Средняя	30	—	CTGCA'G	18	1
*Pvu*I	Высокая	37		CGATCG	3	1
*Pvu*II	Средняя	37		CAG'CTG	15	1
*Rsa*I	»	37		GT'AC	>50	3
*Sac*I	Низкая	37		GAGCT'C	2	0
*Sac*II	»	37		CCGC'GG	4	0
*Sac*III	Высокая			ACGT	>10	6
*Sal*I	»	37	+	G'TCGAC	2	1
*Sau*3AI	Средняя	37		'GATC	>50	22
*Sau*96I	»	37		G'GNCC	>30	15
*Sma*I	(1)	37		CCC'GGG	3	0
*Sst*I	Низкая	37		GAGCT'C	2	0
*Sst*II	»	37		CCGC'GG	3	0
*Sst*III	Высокая			ACGT	>10	6
*Taq*I	Низкая	65	+	T'CGA	>50	7
*Tha*I	»	60	+	CG'CG	>50	23
*Xba*I	Высокая	37		T'CTAGA	1	0
*Xho*I	»	37	—	C'TCGAG	1	0
*Xma*I	Низкая	37		C'CCGGG	3	0

Буфер	NaCl	Трис	$MgSO_4$	ДТТ
С низкой концентрацией соли	0	10 мм (pH 7,4)	10 мм	1 мМ
Со средней концентрацией соли	50 мМ	10 мм (pH 7,4)	10 мм	1 мМ
С высокой концентрацией соли	100 мМ	50 мм (pH 7,4)	10 мм	0
(1)	20 мМ KCl	10 мм (pH 8)	10 мм	1 мМ

Приложение 8

Емкость векторов, образуемых на основе фага λ

Фермент	Вектор	Размер вставки, приводящей к геному нормальной длины, kb	Размер вставки, приводящей к удлинению генома на 5%, kb	Минимальная вставка, при которой получается жизнеспособный фаг, kb	Используемые генетические маркеры		
					att	*red*	*imm*
*Eco*RI	λgt1-λB	13,4	15,9	1,1	—	—	λ*c*I857
*Eco*RI	λgt4-0	10,0	12,5	0	+	+	λ*c*I857
*Eco*RI	λgt5-*lac*5	15,6	18,0	3,4	—	—	λ*c*I857
*Eco*RI	λsep6-*lac*5²	18,0	20,5	5,8	—	—	21*c*I⁻
*Eco*RI	λgt7-*ara*6	14,2	16,6	1,5	—	+	λ*c*I⁻
*Eco*RI	Харон 4	18,8	21,3	6,6	—	—	λ*c*I⁻
*Eco*RI	λ607	9,2	11,6	0	—	+	434*c*I⁺*
*Hin*dIII	λ590	9,2	11,6	0	—	+	434*c*I⁺*
*Hin*dIII	λ760	14,7	17,1	2,4	—	—	λ*c*I⁻
*Sal*I	λgt30-*Ec*6	16,4	18,9	4,2	—	+	21*c*I⁻
*Sst*I	λgt40-0	9,7	12,1	0	—	—	λ*c*I857

*Вставка в ген *c*I фага 434. Поэтому гибриды являются *c*I⁻ и образуют прозрачные бляшки.

Приложение 9

Рестрикционные карты

I. Карты фага λ и векторов, образуемых на основе фага λ

Ранее были описаны некоторые из векторов, образованных на основе фага λ, которые были использованы для клонирования чужеродной ДНК и оказались очень удобными. На основе фага λ сконструировано много векторов. Однако большинство из них либо не было использовано для клонирования чужеродной ДНК, либо было сконструировано не самым оптимальным образом.

На рис. 1 приведена карта генома фага λ, на которой указаны координаты (в долях от длины генома λ^+) многих фаговых генов. Под картой приведены некоторые делеции и замещения. Изменение размера ДНК фага λ с делецией или замещением (в kb) приводится под названием затронутой области (например, область иммунности i21 на 2,45 kb короче замененной области у фага λ^+). Под линией, изображающей замещение, указан размер этой не принадлежащей фагу λ последовательности (в kb). Приведены также координаты концов делеций и замещений на карте фага λ.

На рис. 2 и 3 показаны сайты расщепления ДНК фага λ рестриктирующими эндонуклеазами. Координаты этих сайтов определили Филипсен и Девис (Philipsen, Davis, готовится к печати) методами электронной микроскопии и электрофореза в агарозном геле, при помощи которых были получены сравнительные данные о длинах и подвижностях фрагментов ДНК фага λ и фрагментов ДНК φX174. Результаты, полученные методами электронной микроскопии и электрофореза, очень хорошо согласуются для всех фрагментов, за исключением тех, которые находятся вблизи координаты 0,85. Длины фрагментов из этой области, определенные с помощью электронного микроскопа, несколько превосходили те длины, которые были установлены по электрофоретической подвижности. Данные, представленные на карте, получены при усреднении результатов этих двух определений. Приведенная карта учитывает также и результаты работы Дэниелса с сотрудниками (Daniels et al., 1980). Полученные ими результаты не очень расходятся с нашими определениями. Длина ДНК фага λ^+ определена равной 49,0 kb. Цифры над черточками указывают размеры соответствующих фрагментов (в kb). Цифры под черточками обозначают координаты сайтов рестрикции в долях длины ДНК λ^+.

На рис. 4—14 ДНК векторов λ перекрестно заштрихованы. Делеции обозначены тонкими линиями, над которыми приведе-

ны их названия. Те последовательности, которые происходят не из фага λ, заполнены точками и нарисованы выше основной линии ДНК λ (например, область иммунности фага 21 на рис. 9 или фрагмент ДНК фага φ80 на рис. 10). На рис. 11 и 12 в правом плече показан также маленький кусочек ДНК фага φ80. Его присутствие удаляет сайт *Hind*III из ДНК фага λ. Те последовательности, которые имеются в векторе, но обычно отсутствуют в гибридах (т. е. замещаемые области векторов замещения), обозначены заполненными точками прямоугольниками, расположенными выше линии ДНК фага λ. Под линиями ДНК фага λ приведены координаты разрывов в последовательности ДНК фага λ. Над линиями ДНК указаны длины сегментов в kb. Указаны также полные длины левого и правого плеча в kb.

Литература

Daniels D. L., de Wet J. R., Blattner F. R.. 1980. J. Virol. (в печати).

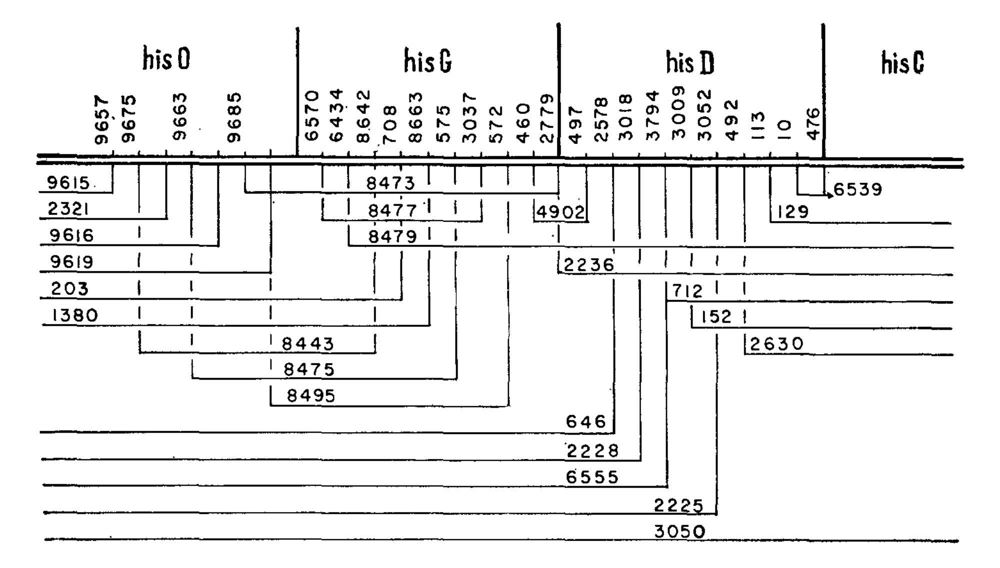
II. Карта плазмиды pBR322

Плазмида pBR322 — самая популярная плазмида, широко используемая для субклонирования фрагментов в клетках *E. coli*. Она содержит область начала репликации, полученную от плазмиды ColE1. Поэтому число копий самой этой плазмиды и связанной с ней ДНК достигает 30 на клетку. Плазмида pBR322 несет также гены, которые сообщают содержащим ее клеткам устойчивость к высоким концентрациям таких антибиотиков, как тетрациклин и ампициллин. Ген Tet^R лежит в области нуклеотидов 0—1500 на приведенной физической карте, а ген Amp^R занимает область нуклеотидов 3600—4300. Начало репликации локализовано вблизи нуклеотида 2500.

Для многих рестриктаз в ДНК плазмиды pBR322 имеется лишь по одному сайту-мишени. Поэтому эти сайты можно использовать для клонирования. К таким рестриктазам относятся *Bam*HI, *Sal*I и *Hind*III (сайты для которых находятся в пределах гена Tet^R), *Pvu*I и *Pst*I (сайты для которых лежат в пределах гена Amp^R), и *Eco*RI, *Ava*I, *Pvu*II, *Cla*I и *Bal*I (сайты для которых лежат вне последовательностей, необходимых для устойчивости к лекарственным препаратам или для репликации).

Приложение 10

Карта делеций в гистидиновом опероне



Приложение 11

Шаблоны

		1	2		
	3	4	5	6	
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
	19	20	21	22	
		23	24		

		1	2	3		
	4	5	6	7	8	
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29
	30	31	32	33	34	
		35	36	37		

		1	2	3	4		
	5	6	7	8	9	10	
11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	32	33	34
35	36	37	38	39	40	41	42
	43	44	45	46	47	48	
			49	50			

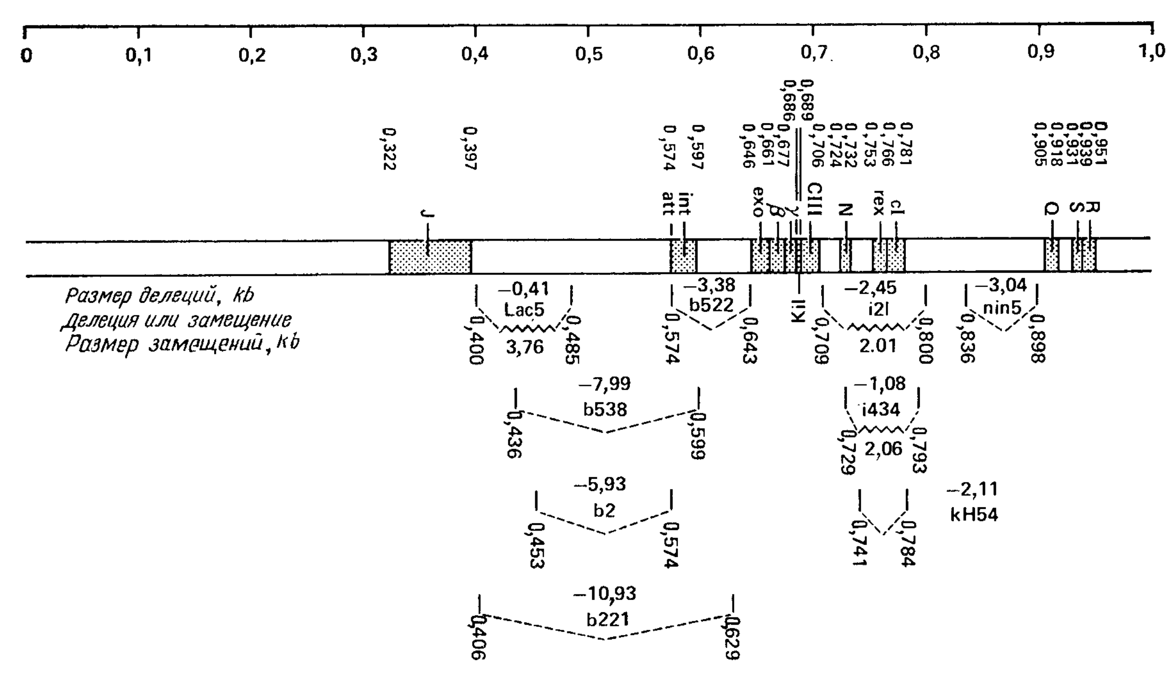


Рис. 1. Карта фага λ.

Рис. 2. Сайты расщепления ДНК фага λ рестриктирующими эндонуклеазами.

Рис. 3.

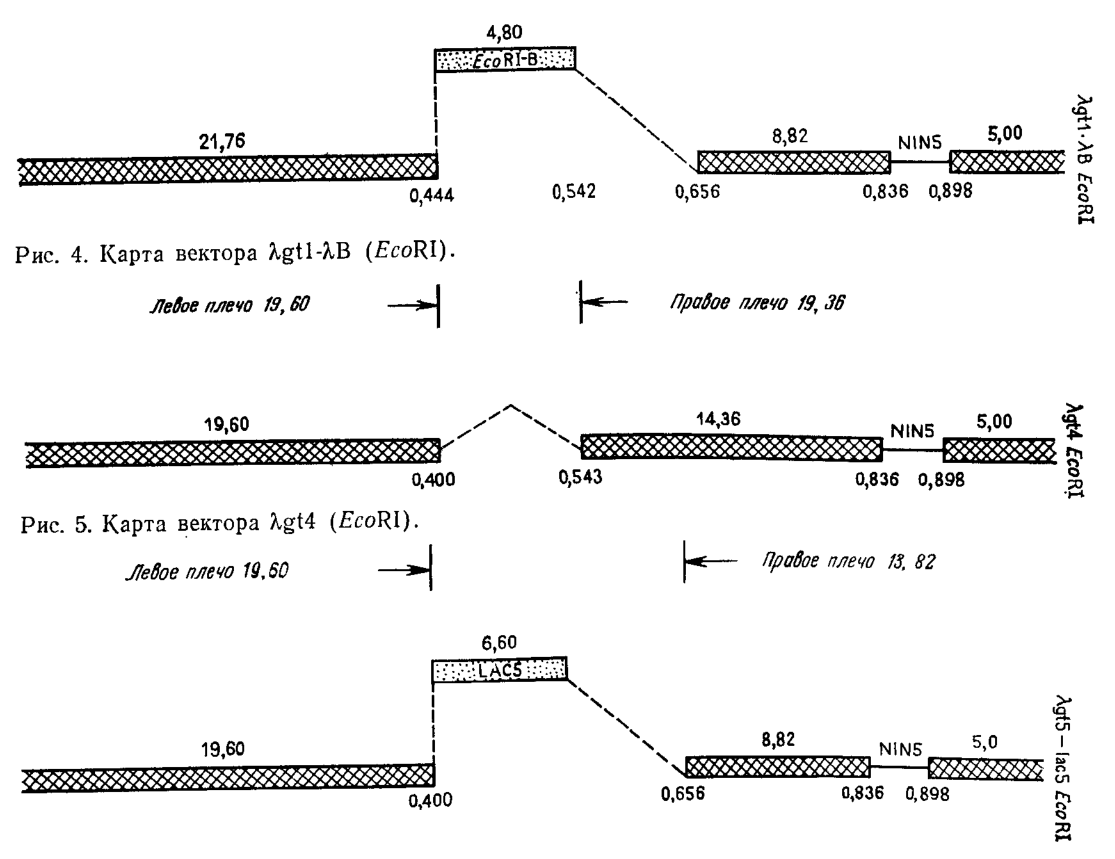


Рис. 4. Карта вектора λgt1-λB (*Eco*RI).

Рис. 5. Карта вектора λgt4 (*Eco*RI).

Рис. 6. Карта вектора λgt5-lac5 (*Eco*RI)

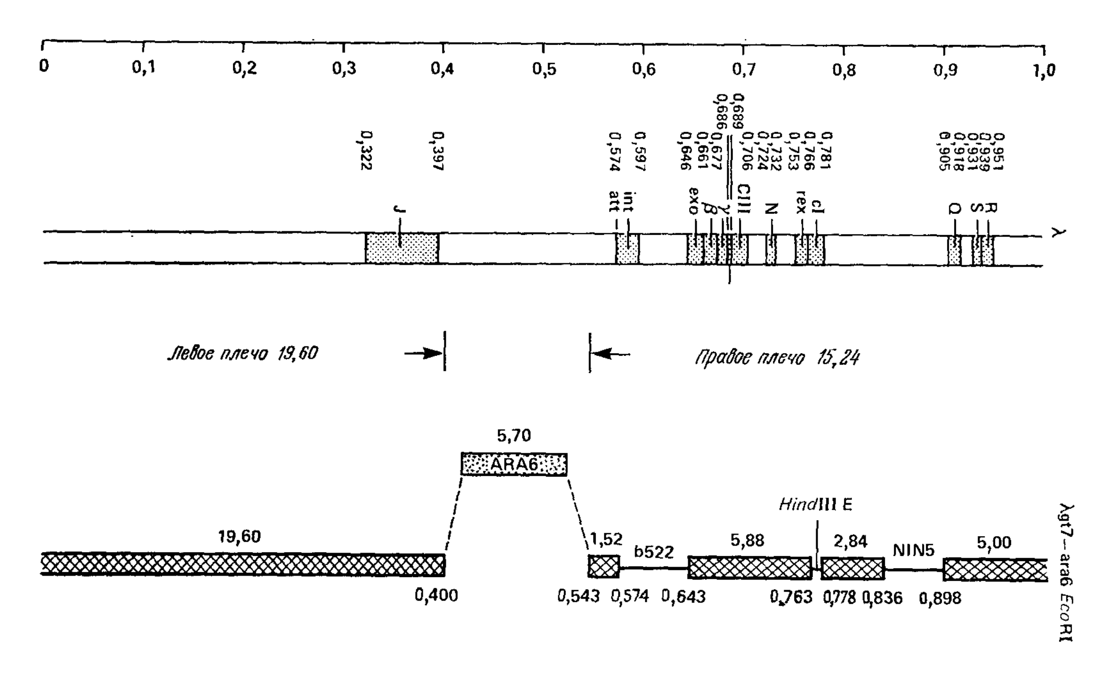


Рис. 7. Карты фага λ и вектора λgt7-ara6 (*Eco*RI).

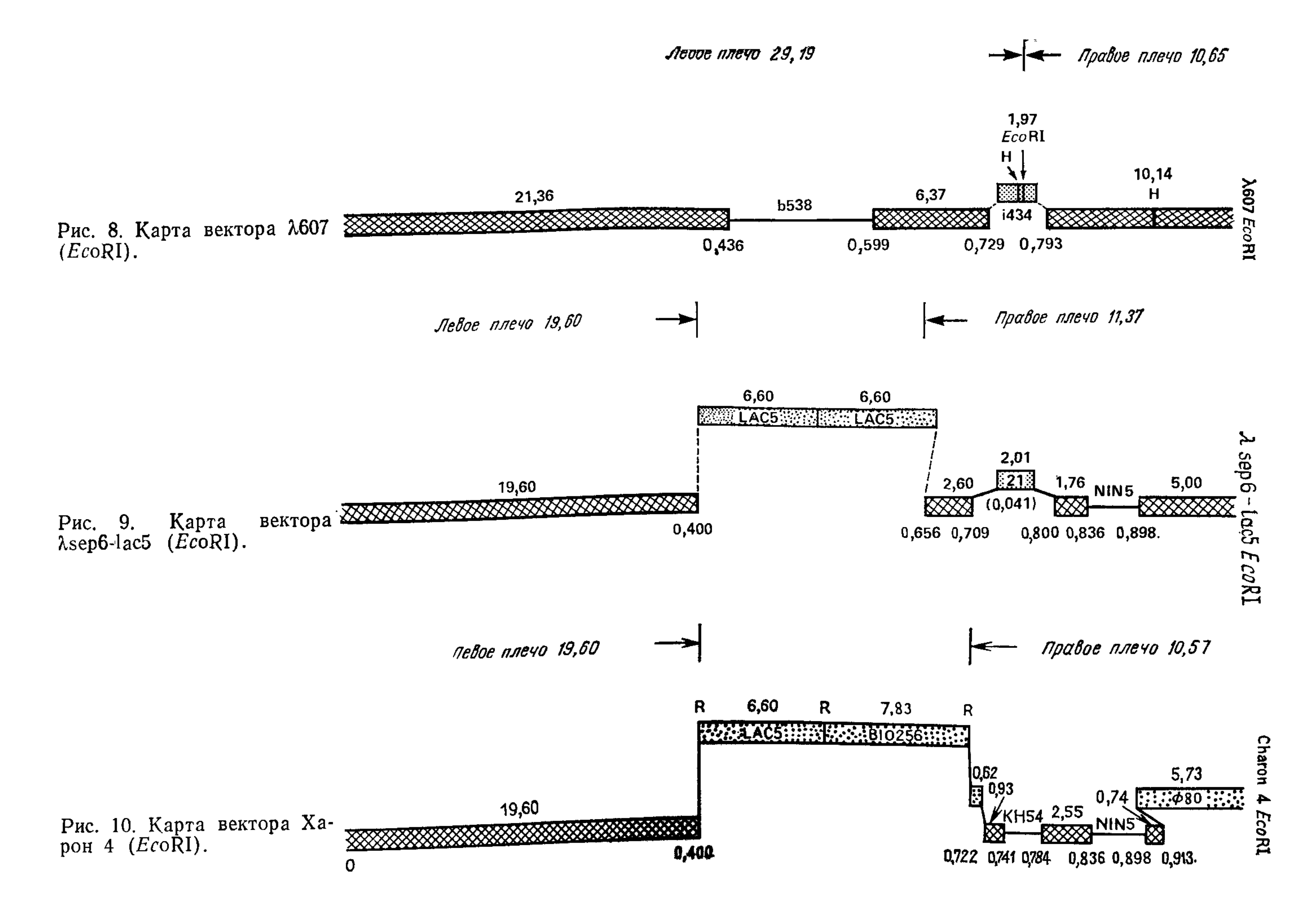


Рис. 8. Карта вектора λ607 (*Eco*RI).

Рис. 9. Карта вектора λsep6-lac5 (*Eco*RI).

Рис. 10. Карта вектора Харон 4 (*Eco*RI).

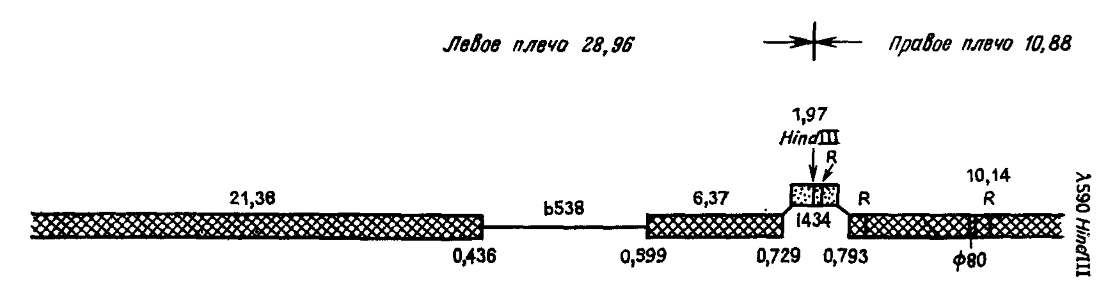


Рис. 11. Карта вектора λ590 (*Hind* III).

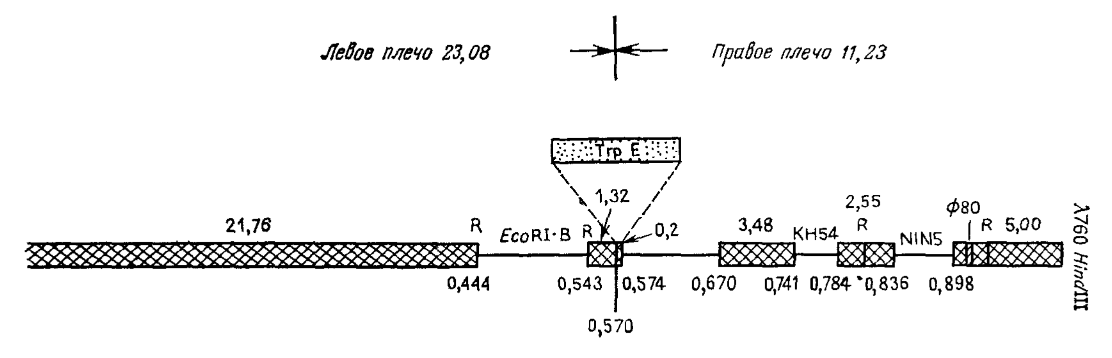


Рис. 12. Карта вектора λ760 (*Hind* III).

Левое плечо 22,83 Правое плечо 9,75

6,00
Ec6
(0,12)
2,01
21
(0,041)
19,89
b221
1,76
NIN5
5,00
0,406
0,629
0,709
0,800
0,836
0,898
0,679 SalI
0,689 SalI
0,694 XhoI
λgt30–Ec6 SalI, XhoI

Рис. 13. Карта вектора λ*gt30-Ec6* (*Sal* I, *Xho* I).

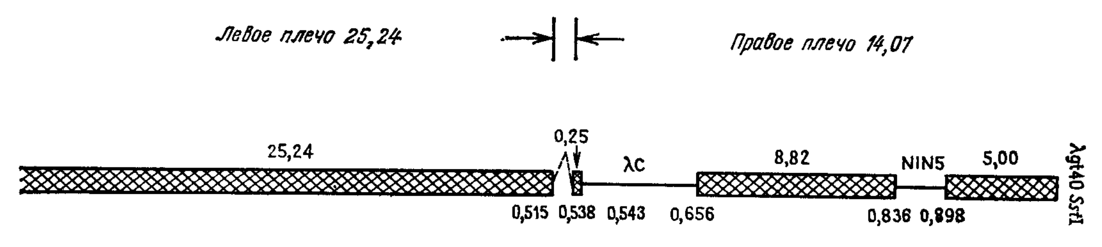
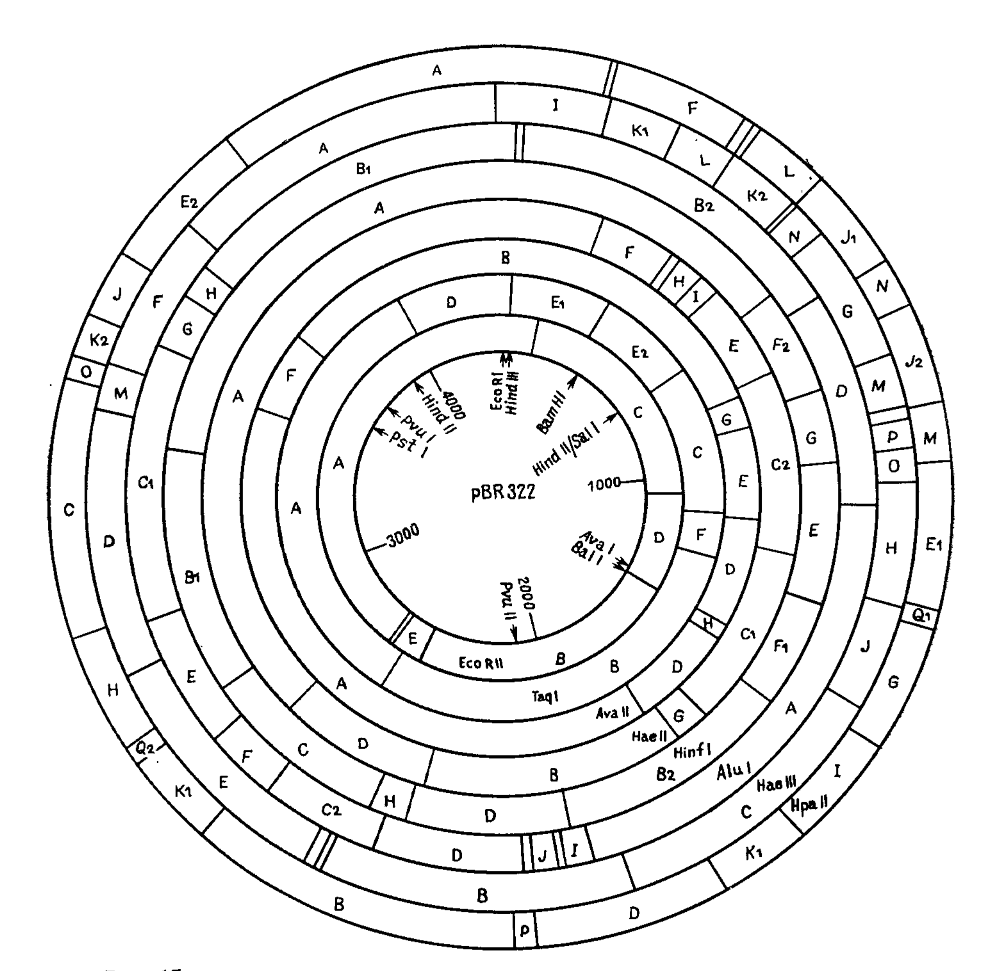


Рис. 14. Карта вектора λgt40 (*Sst* I).



pBR322
1000
2000
3000
4000
EcoRI
HindIII
BamHI
HindII/SalI
AvaI
BalI
PvuII
HindII
PvuI
PstI
EcoRII
TaqI
AvaII
HaeII
HinfI
AluI
HaeIII
HpaII

Рис. 15.

Содержание

Раздел I. Эксперименты

Раздел II. Методики

Раздел III. Приложения

Рональьд Девнс, Дэвид Ботстайн, Джон Рот

МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ.
ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

Ст. научн. редактор Л. Г. Тер-Саркисян
Мл. научн. редактор З. В. Соллертинская
Художник В. Е. Карпов
Художественный редактор А. Я. Мусин
Техннческий редактор Л. П. Ермакова
Корректор В. С. Соколов

ИБ № 3993

Сдано в набор 09.04.84. Подписано к печати 31.10.84. Формат 60×90/16. Бумага графская № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая. Объем 5,50 бум. л. Усл. л. 11. Усл. кр.-отт. 11,12. Уч.-изд. л. 10,35. Изд. № 4/3629. Тираж 5000 экз. Зак. Цена 1 р. 60 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
129820, Москва И-110, ГСП, 1-й Рижскнй пер., 2.

Ярославский полиграфкомбииат Союзполиграфпрома прн Государствеином ком СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Яросл ул. Свободы, 97.

1 р. 60 к.